



TESIS DOCTORAL

**APROXIMACIÓN EMPÍRICA AL RESULTADO DE UN
TRATAMIENTO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN
FUNCIÓN DEL FACTOR MASCULINO**
Generación de un algoritmo pronóstico

Departamento de Ginecología y Obstetricia
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

JULIO GIJÓN DE LA SANTA
2017

Vicente Badajoz Liébana, Licenciado en Biología, Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, y coordinador del Laboratorio de Fecundación In Vitro de Ginefiv; **M^a Carmen Cañadas Gálvez**, Licenciada en Biología, Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid y el Profesor **D. José Manuel Bajo Arenas**, Catedrático de Ginecología y Obstetricia de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado: **“APROXIMACIÓN EMPIRICA AL RESULTADO DE UN TRATAMIENTO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN FUNCIÓN DEL FACTOR MASCULINO. GENERACIÓN DE UN ALGORITMO PRONÓSTICO”** ha sido realizado por D. Julio Gijón de la Santa bajo su dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis para alcanzar el grado de Doctor ante el tribunal correspondiente en la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 23 de Mayo de 2017

Dr. Vicente Badajoz Liebána

Dra. M^a Carmen Cañadas Galvez

Prof. D. José Manuel Bajo Arenas

Para Rosa

Para mis padres y mi hermano

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Jose Manuel Bajo Arenas, por animarme a la realización de esta tesis. Sin su apoyo no hubiese sido posible.

Al Doctor Vicente Badajoz por permitirme formar parte de su equipo y por todo el apoyo y ánimo a lo largo de estos años.

A la Doctora M^a Carmen Cañadas porque desde mis inicios en el laboratorio su apoyo ha sido incondicional.

A todo el equipo del laboratorio de Ginefiv, amigos más que compañeros de trabajo.

A mis amigos de Ciudad Real y Alcalá que siempre están cuando los necesito.

A mi familia por ayudarme en todo desde siempre.

Gracias.

RESUMEN

1.-Introducción.....	15
2.-Hipótesis y objetivos	16
3.-Material y métodos	16
4.-Resultados	17
5.-Discusión.....	19
6.-Conclusiones	22

INTRODUCCIÓN

1.-Desarrollo histórico de la reproducción asistida	27
2.-El análisis seminal	31
2.1.-Concentración espermática.....	33
2.2.-Motilidad espermática.....	34
2.3.-Morfología espermática.....	35
2.4.-Pruebas adicionales.....	37
3.-Generación embrionaria.....	39
3.1.-Fecundación y desarrollo embrionario.....	41

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.-Hipótesis y objetivos	47
1.1.-Objetivos.....	48

MATERIAL Y MÉTODOS

1.-Selección de casos	53
2.-Estimulación ovárica	54
3.-Valoración seminal.....	56
3.1.-Análisis in situ:.....	56
3.2.-Análisis extemporáneo.....	61
3.3.-Elección de tratamiento.....	61
3.4.-Datos obtenidos.....	62
3.5.-Fragmentación del ADN espermático	63
3.6.-Pacientes Azoospermicos.	65
4.-Preparación de muestras espermáticas	67
4.1.-Capacitación espermática	67
4.2.-Preparación de muestras de baja calidad/biopsia testicular.....	68
4.3.-Preparación de muestras criopreservadas.	69
5.-Equipos y medios utilizados en el laboratorio de Andrología	71
6.-Laboratorio de Fecundación In vitro(FIV)	72
6.1.-Microinyección espermática (ICSI).....	73
6.2.-Fecundación y desarrollo embrionario.....	75
6.3.-Transferencia embrionaria	79
7.-Equipos y medios utilizados en el laboratorio de Fecundación In vitro (FIV)	81
8.-Análisis estadístico	82

RESULTADOS

1.-Datos obtenidos	87
2.-Estadística descriptiva de la población de estudio	90
3.-Grupo de cultivo embrionario con transferencia en día +3.....	92
4.-Grupo de cultivo embrionario con transferencia en día +5.....	95
5.-Subgrupos por número de ovocitos en metafase II	98
5.1.-Transferencia en día +3	99
5.2.-Transferencia en día +5	101
5.3.-Comparación entre días de transferencia:.....	102
5.4.-Grupos 0-5 ovocitos y mas de 10 ovocitos obtenidos en punción	106
6.-Pacientes con fragmentación del ADN espermático alterado	108
6.1.- Ciclos con transferencia en día +3.....	108
6.2.-Ciclos con transferencia en + 5	110
7.-Pacientes sometidos a TESE.....	112
7.1.-TESE por alto grado de fragmentación.	118
8.-Análisis Multivariante de la población a estudio.....	120

DISCUSIÓN

1.- Muestra seminal: “in vivo” vs “in vitro”	129
2.-Datos generales de la pacientes sometidos a TRA.....	136
3.-Transferencia en día + 3	137
4.-Transferencia en día +5	142
5.-Transferencia en día +3 frente a transferencia en día +5.....	147
5.1.- Desarrollo embrionario de pacientes con morfología alterada	148
5.2.-Desarrollo embrionario de pacientes con morfología normal.....	150
5.3.- La influencia de la morfología en el desarrollo embrionario	151
6.-Pacientes con fragmentación de ADN espermático alterado y MACS	153
7.-Pacientes sometidos a TESE.....	157
7.1.-Pacientes sometidos a TESE por alta fragmentación espermática	160
8.-Análisis multivariante de la población de estudio	162

CONCLUSIONES

1.-Conclusiones	167
------------------------------	------------

PERSPECTIVAS FUTURAS

BIBLIOGRAFÍA

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

RESUMEN

1.-Introducción

El correcto diagnóstico de una muestra seminal ha sido un parámetro de suma importancia a la hora de diagnosticar las causas de una posible infertilidad. Sin embargo, con la aparición de técnicas de reproducción asistida como la Microinyección espermática (ICSI), la tendencia en los laboratorios de RA ha sido de obtener y seleccionar espermatozoides y utilizarlos para la fecundación ovocitaria sin profundizar en la posible patología espermática.

En el presente estudio se busca exponer las diferentes alteraciones espermáticas, tanto a nivel morfológico como de calidad genómica y sus consecuencias en el desarrollo embrionario en el laboratorio. Además, con la aparición de nuevos medios y condiciones de cultivo embrionario, al poder mantener los embriones más tiempo en el laboratorio, siendo vigilados por el biólogo, se pueden expresar alteraciones en la evolución de dichos embriones con lo que se podrán identificar las consecuencias de las alteraciones espermáticas de los pacientes.

Por otra parte, estudios sobre la calidad del ADN espermático, el estudio de la fragmentación, nos pueden indicar el porqué de la no consecución de la gestación. Al producirse roturas en el ADN, el desarrollo embrionario puede verse afectado, con lo que esto será objeto de estudio. La técnica de MACS (Selección espermática magnética) nos permite excluir espermatozoides que están en proceso de apoptosis debido al ADN fragmentado y que no pueden ser excluidos al realizarse una ICSI simplemente por su morfología.

Otras muestras seminales de complicada manipulación y selección, como las obtenidas mediante biopsia testicular serán estudiadas, ya que la selección partirá de un número espermático muy bajo, a lo que hay que añadir que los espermatozoides procedentes de biopsia están en diferentes estadios madurativos.

El objetivo final de conseguir un niño en casa cuanto antes se alcanzará transfiriendo embriones de calidad óptima, y para ello deberemos realizar una buena selección embrionaria, tanto en el desarrollo de los embriones como en la elección final de los embriones a transferir.

2.-Hipótesis y objetivos

Nuestra hipótesis de partida será que muestras con morfologías espermáticas muy alteradas van a influir en el desarrollo embrionario. Por tanto, es de esperar que en pacientes con muestras alteradas al realizarse el cultivo largo (estadio de blastocisto, día +5 del desarrollo) a partir de día +3 , punto a partir del que la propia carga genética del embrión empieza a expresarse, se reflejen esas alteraciones en el desarrollo embrionario.

En pacientes sin espermatozoides en eyaculado (azoospermicos) en los que se realizó biopsia testicular, se buscó la optimización del cultivo embrionario en el laboratorio.

3.-Material y métodos

Para exponer la influencia de la morfología espermática, se generaron dos grupos principales de pacientes, teniendo en cuenta el criterio de Tygerberg, el cual es el recomendado por la OMS(2010) y cuyo valor de referencia se establece en el 4% de formas normales.

Los grupos fueron:

- Pacientes con morfología gravemente alterada ($\leq 2\%$ de formas normales). Se realizó cultivo embrionario con transferencia en día +3 y día +5 del desarrollo embrionario.
- Pacientes con morfología normal ($> 4\%$ de formas normales). Se realizó cultivo embrionario con transferencia en día +3 y día +5 del desarrollo embrionario.

En el caso de que no se consiguiese embarazo en estos ciclos, se indicó una prueba adicional, el índice de fragmentación espermática (IFE) cuyo valor de referencia es del 27%. En pacientes con IFE alterado, se realizó la técnica de MACS. En este caso, se generaron los siguientes grupos:

- Pacientes con IFE alterado sometidos a MACS con morfología gravemente alterada. Se realizó cultivo embrionario con transferencia en día +3 y día +5 del desarrollo embrionario.
- Pacientes con IFE alterado sometidos a MACS con morfología normal. Se realizó cultivo embrionario con transferencia en día +3 y día +5 del desarrollo embrionario.

Por último, se generó un grupo de pacientes diagnosticados de azoospermia obstructiva y sometidos a biopsia testicular (TESE). Se realizó cultivo embrionario con transferencia en día +2,+3 y +5.

En todos estos grupos solo se tuvieron en cuenta pacientes con óvulos propios (no ovodonación) y en todos se realizó la Microinyección espermática (ICSI).

4.-Resultados

Se realizaron 2261 ciclos de TRA en nuestra clínica, Ginefiv. Los resultados obtenidos fueron resumidos en las siguientes tablas:

Día +3	Embriones fecundados	Embriones totales	Embriones transferidos	Tasa de gestación evolutiva
Morfología patológica	5,09±1,56	3,79±2,63*	1,74±0,46	32,5%*
Morfología normal	5,15±2,447	3,66±1,85*	1,70±0,49	37.35%*

Día +5	Embriones fecundados	Embriones totales	Embriones transferidos	Tasa de gestación evolutiva
Morfología patológica	8,29±3,35	3,21±1,88*	1,04±0,66	44,4%
Morfología normal	8,51±3,39	4,66±2,46*	1,00±070	46,71%*

Se ajustaron las comparaciones seleccionando los ciclos en los que se obtuvieron entre 5 y 10 ovocitos en estadio de metafase II, número óptimo para el cultivo y en el cual el número de ovocitos no va a ser limitante para que se exprese el genoma embrionario.

5-10 MII	Embriones fecundados	Embriones totales	Tasa de gestación evolutiva
Morfología patológica +3	6,03±1,13	4,39±1,51*	33,49%*
Morfología Patológica +5	6,27±1,72	3,45±1,62*	46,56%*

5-10 MII	Embriones fecundados	Embriones totales	Tasa de gestación evolutiva
Morfología normal +3	6,05±1,13*	4,15±1,80	43,60%
Morfología normal +5	6,63±1,40*	4,07±1,64	45,07%

Los pacientes con IFE alterado y tras la realización de MACS se obtuvieron los siguientes resultados:

Día +3 IFE MACS	Embriones fecundados	Embriones totales	Tasa de gestación evolutiva
Morfología patológica	3,62±1,62*	2,43±1,13*	29,41%
Morfología normal	3,23±2,51*	2,00±1,25*	27,27%

Día +5 IFE MACS	Embriones fecundados	Embriones totales	Tasa de gestación evolutiva
Morfología patológica	7,39±2,86*	3,74±2,03*	39,13%
Morfología normal	4,50±2,64*	2,06±1,77*	37,55%

En cuanto a pacientes con muestra procedente de biopsia testicular, se obtuvieron los siguientes datos:

TESE	Embriones fecundados	Embriones totales	Tasa de gestación evolutiva
Día +2	1,83±1,14*	1,91±1,01*	29,5%*
Día +3	4,46±2,15*	2,75±1,91*	40,03%*
Día +5	7,13±4,33*	3,94±3,94*	56,2%*

Dónde los resultados marcados con * representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

5.-Discusión

El día en que realizar la transferencia embrionaria se ha postulado como un factor de debate en los últimos años con el desarrollo de los medios y condiciones de incubación. No está claro si para todos los pacientes es beneficioso el cultivo largo, y son muchos los centros en los que no se realiza.

La morfología espermática también ha estado en discusión, pues han sido muchas las aproximaciones a su valoración, y diversos grupos han establecido diferentes clasificaciones al respecto.

Para averiguar si la morfología es un parámetro clave a la hora del desarrollo correcto de un embrión, se estudiaron pacientes con claras patologías a ese nivel y se compararon con pacientes con muestras, a priori, normales.

Los resultados obtenidos en cuanto a los ciclos con transferencia en día +3, pudimos observar una diferencia de un 6,6% en la tasa de gestación a favor del grupo con muestras seminales normales (35,76% frente a 42,36%). Con un número similar de embriones conseguidos en cultivo, es la tasa de gestación la que nos refleja la viabilidad de esos embriones.

Si observamos los ciclos con transferencia en estadio de blastocisto (día+5) es en el número de embriones obtenido por ciclo donde vimos una gran diferencia: la media fue menor en el grupo procedente de morfologías alteradas. Es decir, hay un mayor número de embriones que no llegan a estadio de blastocisto si proceden de

muestras seminales con la morfología gravemente alterada: concretamente una media de 3,21 embriones frente a 4,66 en el grupo de muestras seminales con morfología normal.

Esto lo podemos explicar porque son muchos los factores del desarrollo embrionario inherentes al espermatozoide, y es a partir del día +3 hasta la consecución del estadio de blastocisto cuando se van a expresar.

Al realizar la selección de casos en los que se obtuvieron entre 5 y 10 metafases II y al observar el desarrollo en las muestras patológicas ocurrió lo mismo: cuando los embriones procedentes de estas muestras se transfirieron en día +3 obtuvimos una tasa de gestación clínica de 33,49% mientras que si se transfirieron en día +5 fue de 46,56%.

En el caso de las embriones procedentes de muestras morfológicamente normales observamos que las tasas de gestación en día +3 fue de 43,60% y en día +5 de 45,07%.

Por tanto, podemos corroborar que si a un paciente se le diagnosticó una grave patología seminal a nivel de la morfología, en el caso de transferir en día +3 , con un número de ovocitos y embriones similares que en una muestra normal, la tasa de gestación era menor. Sin embargo, muestras alteradas con transferencia en día +5 dan como resultado tasas de gestación similares que las del grupo de morfología normal.

Además, debemos incidir, que en cuanto a la media de embriones, cuando las muestras normales se dejaban 2 días más en cultivo, el número fue muy similar (4,15 en día +3 y 4,07 en día +5), mientras que en las muestras patológicas la media de embriones fue mucho menor (4,39 en día +3 frente a 3,45 en día +5).

Podemos postular, por tanto, que estos embriones que en día +3 fueron clasificados como viables no generaron embarazo, como ha quedado demostrado en la menor tasa de gestación en día +3 en embriones procedentes de muestras patológicas

En cuanto a las muestras con fragmentación del ADN espermático en los que se realizó el MACS, al centrarnos en la tasa de gestación clínica esta fue muy similar en ambos grupos en día +3: 29,41% y 27,27%. Ligeramente menor en pacientes con muestras con morfología normal, lo esperable después de haber obtenido una media de embriones también menor.

Esto contrasta con los resultados que habíamos obtenido anteriormente en pacientes en los que no se había realizado el estudio de fragmentación del ADN espermático: en ese caso, los pacientes con morfología espermática alterada la tasa de gestación fue significativamente menor que en pacientes con morfología normal

En transferencias en estadio de blastocisto en muestras con IFE alterado, pudimos observar que las tasas de gestación fueron superiores a las obtenidas en transferencia en día +3: 39,13% y 37,55%. Al igual que en el grupo de MACS con transferencia en día +3, no hubo diferencias significativas dependiendo si la morfología estaba alterada o no.

Por tanto el MACS se postula como una técnica de selección espermática no solo a nivel de la fragmentación del ADN espermático, sino a nivel de morfología.

Por último, en pacientes con muestra seminal procedente de biopsia testicular, aunque la tasa de fecundación fue menor que en ciclos de ICSI, al observar las tasas de gestación vemos que son muy cercanas a los datos de muestra procedente de eyaculado.

Si bien es cierto que la tasa de gestación de los embriones transferidos en día +2 fue de 29,5%, la tasa de gestación de transferencia en día +3 fue de 40,03%, muy similar a la tasa de gestación general en día +3, de 39,06%. Si se transfirió en estadio de blastocisto fue de 56,2% mientras que la tasa de gestación general en día +5 fue de 52,48%. Son tasas similares a las muestras procedentes de eyaculado, tal y como han descrito otros grupos lo cual certifica que aunque la tasa de fecundación es mas baja, la tasa de gestación no lo es.

6.-Conclusiones

- La morfología espermática afecta al desarrollo embrionario: embriones generados con muestras morfológicamente alteradas alcanzan menor tasa de evolución a día + 5, por tanto, los pacientes con graves alteraciones en la morfología espermática se ven beneficiados de realizar el cultivo largo (estadio de blastocisto).
- En pacientes con IFE alterado la influencia de la morfología alterada sobre la tasa de gestación se minimiza: El MACS nos permite excluir espermatozoides con morfología alterada.
- En cuanto a los pacientes en los que se realizó una biopsia testicular debido a azoospermia obstructiva pudimos observar que, aunque la tasa de fecundación es menor, la tasa de gestación clínica fue similar a la de pacientes con muestra procedente de eyaculado.

INTRODUCCIÓN

Se estima que un 20% de las parejas en edad fértil tendrá que recurrir a técnicas de Reproducción Asistida, y se deberán enfrentar a problemas tanto psicológicos como económicos dentro de su vida en común al enfrentarse a estos tratamientos[1].

Nuestro objetivo es ayudarles a conseguir un niño en casa en el menor plazo posible por lo que debemos optimizar nuestro trabajo en el laboratorio. Para ello, un correcto diagnóstico de la pareja estéril nos ayudará a conseguir un modelo que prediga cual será el éxito del tratamiento y de nuestro trabajo, con el máximo grado de acierto posible.

1.-Desarrollo histórico de la reproducción asistida

Desde hace milenios la reproducción asistida camina junto al ser humano. Desde que el hombre domesticó a los animales y la aparición de la ganadería, se han realizado cruces dirigidos a la mejora de las especies , ya sea para un crecimiento mas rápido, o un aumento de la producción de la alimentación. Se seleccionaba un macho reproductor según los criterios a perpetuar y se cruzaba con diferentes hembras reproductivas.

En los siglos XVI-XVII la religión y la filosofía seguían buscando el origen del ser vivo, cual era el método de desarrollo del nuevo ser y como se generaba y se integraba el espíritu en el nuevo ser.

Con la aparición de expertos en microscopía como Marcelo Malpighi y Antón Von Leeuewnhoek[2] se descubrieron distintos tipos celulares, tejidos, etc. Sin embargo, el microscopio no iba a dar respuesta a la cuestión religiosa, que hoy en día sigue sin ser resuelta.

Van Leeuwenhoek, sin ningún tipo de formación científica fue el primero en ver y describir los espermatozoides, junto con su asistente Johannes Ham en 1678. Se especializó en el desarrollo del microscopio. Junto con su amigo anatomopatólogo Regnier de Graaf, llamó la atención de la Royal Society de Londres, lo que le permitió expandir sus conocimientos y realizar investigaciones en conjunto.

Sin embargo Van Leuwenhoek no llegó mas allá, y su hipótesis fue que el espermatozoide contenía el nuevo ser, y era la parte femenina la que simplemente actuaba como reservorio.

En una carta a William Bounker de la Royal Society, en 1798, le envía una imagen de células germinativas de humano y perro. Las describe como pequeños animales de menos de un millón de veces mas pequeña que el tamaño de un grano de arroz, con colas ondulantes, tendones y juntas.

Harvey diseccionó y describió en su obra *"Exercitationes de generatione animalium"* numerosos animales y no observó ni semen ni óvulos justo después del acto reproductivo. Sin embargo semanas después si observó un sáculo lleno de fluido, el cual pensó que era un huevo. Esto lo confirmó De Graaf, y distinguió entre folículo y óvulo.

En 1798 Spallanzani realizó la primera inseminación artificial descrita y registrada en un perro, que tras 62 días de gestación dió a luz tres cachorros. Este investigador fue el primero en describir los efectos del frío en los espermatozoides, observando que al bajar la temperatura, estos se volvían inmóviles.

A principios del S.XIX Prévost y Dumas confirman que la motilidad es esencial para que la fusión espermatozoide-ovocito de lugar a la fertilización de los huevos.

Karl Ernst Von Baer describió el desarrollo de los mamíferos a partir del óvulo en 1827, con lo quedaba demostrada su existencia. Además, Von Baer refuta la teoría preformacionista, demostrando la inexistencia de ningún rasgo de organismos en miniatura en los inicios del desarrollo, como decía Van Leeuwenhoek.

Su teoría del desarrollo en el que organismo se diferencia en hojas germinales, tomada de Heinz Pander y Caspar Wolff , se extiende a la totalidad de los animales, fundando así la embriología comparada. Von Baer distingue entre la "hoja vegetal" y la "hoja animal", que, a su vez, se dividirían en otras dos hojas secundarias (diferenciación secundaria) y, finalmente, darían lugar a los órganos (diferenciación terciaria).

En seres humanos al introducirse el papel del donante de semen la inseminación se vuelve muy popular. Los primeros casos registrados son de Guttmacher (1943)[3], Stoughton (1948)[4] y Kohlberg (1953)[5]. Se indicaba en casos de disfunción psicológica o fisiológica, tales como eyaculaciones retrógradas, vaginismo, hipospadias e impotencia.

Philips y Lardy, en 1939[6] fueron los primeros en usar yema de huevo como crioprotector, con lo que otro aspecto de la reproducción asistida estaba apunto de aparecer: la criopreservación de gametos y embriones para su posterior uso.

En 1978 Steptoe y Edwards[7] describieron el primer nacimiento de una niña por TRA. Se recuperaron los ovocitos por laparotomía, y se pusieron en contacto con los espermatozoides de su pareja. Dos días y medio después se transfirió un embrión de 8 células al útero, tras lo cual se consiguió la gestación de la cual nació una niña, Louise Brown.

El principal problema de los tratamientos de FIV era que no eran efectivas con muestras seminales de muy baja concentración, movilidad y morfología.

Con el desarrollo de técnicas de micromanipulación de ovocitos se desarrollaron dos técnicas: La disección parcial de la zona (PZD) y la inseminación subzonal (SUZI).

Fue en 1992 cuando se produjo la revolución en el campo de la reproducción asistida pues Palermo[8] desarrolló la técnica de la ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection), para pacientes en las que la fecundación *in vitro clásica o convencional*

no había dado resultados positivos. Su equipo realizó la inyección de un espermatozoide seleccionado en cada uno de los 47 ovocitos en estadio de metafase II, obteniendo 31 embriones correctamente fecundados, de los cuales 15 se transfirieron a las pacientes.

Finalmente, de este primer estudio nacieron 3 bebés, 2 niños y una niña.

El uso del PZD se volvió controvertido y fue abandonado. Además, las tasas de fecundación realizando ICSI eran sustancialmente mayores que tras SUZI [8][9]. No solo la tasa de fecundación, sino que la evolución embrionaria también aumentaba, así como la tasa de implantación [9].

A partir de esta fecha, el desarrollo y mejora de las condiciones de incubación de los embriones y de los medios de cultivo nos han permitido obtener cada vez mejores tasas de gestación, y aumentar las probabilidades de nuestro fin último, el conseguir un niño sano en casa.

2.-El análisis seminal

Aproximadamente el 15% de las parejas en edad reproductiva no consiguen el embarazo tras 12 meses manteniendo tener relaciones sexuales. De estas, se estima que el 50% son debidas a parámetros anormales de la muestra seminal [10].

Pero estas alteraciones pueden ser muy heterogéneas, con lo que se necesita realizar un estudio personalizado de cada caso.

No sólo la calidad seminal influye en la tasa de éxito en tratamientos de FIV e ICSI, sino el diferente tratamiento y preparación de las muestras se va a ver reflejado en los mismos.

Ya en 1988 Kruger demostró la importancia de la calidad seminal como factor pronóstico en IVF y la necesidad de realizar una clasificación de diferentes rangos de calidad en que podemos clasificar una muestra seminal [11].

Muchos autores aceptan que la calidad seminal junto la calidad ovocitaria son los mejores indicadores sobre el pronóstico de un ciclo de IVF (Kruger, Menkweld 1986)[11] y que valores como la concentración, motilidad y morfología están fuertemente relacionados con la tasa de fertilización ovocitaria [12][13][14].

Pero no ha habido consenso entre los diferentes grupos de estudio al establecer unos valores de referencia. Tal es así, que si estos valores fuesen muy altos, la mayoría de la población quedaría establecida por debajo de la normalidad, especialmente al valorar la morfología espermática y la concentración [15][16].

En el extremo opuesto, el considerar concentraciones de 20 millones de espermatozoides por mililitro como normal por la OMS (1997) ha sido considerada como una concentración demasiado baja, ya que la probabilidad de conseguir una gestación se mantiene constante en torno a concentraciones de 40 millones [17]. En cuanto a concentraciones y movilidades superiores, dan como resultado mayores tasas de gestación[18].

La Organización Mundial de la Salud ha ido proponiendo y publicando su propio criterio de clasificación y manejo de muestras seminales humanas en los años 1987, 1992, 1999 y la más reciente, de 2010. En dichas publicaciones se han propuesto valores de referencia, en la cual podremos clasificar a los pacientes dentro de la población fértil o infértil.

Al estar cada vez más aceptada esta metodología por los laboratorios de Reproducción Asistida, se han podido realizar estudios a nivel mundial y generar distribuciones a partir de estos datos.

Para establecer dichos criterios se generaron grupos de estudio dividiendo la población de varones que habían sido padres en menos de un año de intentar una gestación procedentes de 8 países. A partir de ahí, obtenían los grupos de normalidad con un intervalo de referencia del 95%. (OMS 1999, 2010)

Aun así, algunos autores critican que estos criterios [19] en referencia a la dificultad de medir la movilidad progresiva de los espermatozoides así como la morfología no están basadas en la evidencia y se basan en la dificultad de medir la movilidad progresiva así como la morfología. Sin embargo, publicaciones recientes comparando la morfología espermática en gestaciones in vivo e in vitro, y dividiendo los pacientes en pacientes fértiles y subfértiles han obtenido resultados muy similares a los valores de la OMS [20][21].

La herramienta de valoración de estos parámetros que clásicamente se ha utilizado es el espermiograma como el análisis básico y de utilización rutinaria en un laboratorio de reproducción asistida.

Tanto la OMS como los principales grupos de estudio se centran en tres aspectos básicos y relacionables con la consecución del embarazo: concentración, motilidad y morfología espermática.

2.1.-Concentración espermática.

En 1929 Macomber y Sanders realizaron estudios sobre la concentración espermática en el ser humano, y obtuvieron una media de 100 millones de espermatozoides por mililitro, utilizando pipetas y una cámara de conteo diseñada por ellos. Desde entonces empezó a examinarse semen procedente de parejas que habían conseguido un embarazo (MacLeod, 1951;Gold, 1951), apareciendo discrepancias entre los diferentes grupos, especialmente en cuanto a valores de referencia [22].

MacLeod en 1954 propuso la concentración de 20 millones por mililitro (como valor mínimo de referencia) y de 40 millones por eyaculado, la cual ha seguido vigente hasta las recomendaciones de la OMS de 1999. Ombelet en 1997 y Haugen en 2006 , por el contrario, establecían para poder considerarlo como población fértil concentraciones superiores [22].

Concentraciones menores de estas han estado en discusión sobre su capacidad de conseguir un embarazo. En los últimos estudios realizados hasta el 2011 por la OMS han reducido el valor de referencia hasta los 15 millones por mililitro, siendo las poblaciones con concentraciones de estos valores clasificadas como subfértiles o infértiles.

En este aspecto podemos diferenciar entre número espermático total y concentración espermática.

La concentración espermática refiere al número de espermatozoides por unidad de volumen, mientras que el número total se refiere al conjunto total de los espermatozoides presentes en el eyaculado [23].

Por tanto, el parámetro que nos va a informar sobre la capacidad del testículo de producción espermática es el número total. La concentración nos indicará la función de las glándulas anejas que vierten su fluido junto a los espermatozoides.

En el caso de que no se observe ningún espermatozoide en eyaculado se deberá estudiar al paciente en profundidad: cariotipo, perfil hormonal... siendo clasificado

como posible azoospermia (ausencia de espermatozoides en eyaculado) o criptozoospermia (muy baja concentración de espermatozoides).

2.2.-Motilidad espermática

La motilidad espermática fue relacionada por Kruger en 1988 como factor pronóstico de la gestación [11].

Sin embargo, la valoración de la movilidad espermática a nivel de valor diagnóstico es la que ha sido puesta en duda. No ha sido sino hasta hace poco cuando se han puesto a punto técnicas de valoración de la madurez espermática, pudiéndose relacionar este factor con la movilidad espermática. Además, la falta de un criterio consistente en el que diferenciar las clases de movilidad de los espermatozoides ha generado diversos debates entre los grupos de estudio.

Por otra parte, se han utilizado varios compuestos para mejorar la motilidad espermática "in vitro", tales como las metil xantinas, el grupo de las carnitinas, argininas y kalikreinas.

Finalmente, en la preparación y lavado de una muestra seminal en el laboratorio, se ha observado que pueden mejorar la movilidad de los espermatozoides [24].

Según el manual de la OMS de 2010 [23], se han agrupado los diferentes grupos en espermatozoides móviles progresivos (PR), móviles no progresivos (NPR) y espermatozoides inmóviles (INM), aunque otros grupos han descrito varias categorías de motilidad espermática dependiendo de su desplazamiento y velocidad, clásicamente A, B, C y D.

Esta gradación sigue estando en discusión debido a la subjetividad de la misma, pues la repetibilidad puede variar entre diferentes grupos de investigación.

Además, la concentración de espermatozoides progresivos móviles si se ha asociado con el aumento de tasa de gestación por diferentes grupos de estudio [25][26][27].

2.3.-Morfología espermática

Desde la observación de Van Leeuwenhoek de los espermatozoides al microscopio, este parámetro ha sido ampliamente estudiado y se ha considerado el parámetro más importante como indicador de la fertilidad. Incluso se han referido a él como el reflejo de la competencia funcional espermática.

La cuestión a debate es cómo poder relacionar la cantidad de espermatozoides morfológicamente normales con la probabilidad de producir una gestación, y, dentro del campo de la Reproducción Asistida, cómo relacionarlo con la tasa de gestación.

En este aspecto, no podemos olvidar que el espermatozoide va a desempeñar un papel clave tanto en la formación del embrión a nivel genético, como en la activación ovocitaria y posterior desarrollo embrionario.

Diversos grupos, como Yovich en 1984, Ron-El en 1991 y Parinaud en 1993 [28][29][30] relacionaron anomalías en la morfología de la cabeza espermática con retrasos en la fertilización y baja calidad embrionaria.

Kruger en 1988 [11], fue el primero en comparar la tasa de fecundación ovocitaria y tasas de gestación, analizando 96 parejas sometidas a tratamientos de IVF. Utilizó el criterio estricto, en el cual se consideraba la normalidad morfológica a partir del 14%, para clasificar parejas con el resto de parámetros normales y observó diferencias estadísticamente significativas en los parámetros observados de pacientes con los parámetros dentro de la normalidad.

Sin embargo, este parámetro se ha puesto en continuo debate debido a la falta de objetividad y consenso entre los diferentes grupos. Además, con la aparición de la técnica de ICSI [8] y la posibilidad de seleccionar un único espermatozoide, la valoración morfológica como factor predictivo y determinante ha sido puesta en debate.

Keegan realizó un estudio de 495 parejas infértiles con muestras seminales con concentraciones superiores a dos millones de espermatozoides móviles, y generó

dos grupos: uno con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales superior a la normalidad según el criterio estricto y el segundo con dicho parámetro dentro de la normalidad. No obtuvo diferencias significativas entre la tasa de fecundación ni de nacido vivo [31].

Sin embargo, Koetzee en 1998, obtuvo una media de gestación del 15.2% (60/395) en pacientes clasificados como teratozoospermicos según el criterio estricto frente al 26.0% (355/1368) de pacientes normozoospermicos [32].

No ha existido un criterio común, ni en la preparación de la muestras a valorar ni siquiera en la valoración de la misma.

Ha habido numerosos intentos crear sistemas de clasificación con los que describir las distintas anomalías de un espermatozoides con el fin de enumerar que factores van a constituir si un espermatozoide posee una forma normal o no: Freund (1966), Eliasson (1971), Williams (1964), el criterio estricto de Tygerberg (Kruger 1986, 1988; Menkveld 1990), David (1975), Freund (1966), y las numerosas revisiones del Manual de la OMS (1987, 1992, 1999 , 2010).

Incluso las diferentes tinciones utilizadas en los diferentes grupos de estudio han ido variando, desde el uso de eosina (Eliasson,1971), formalina (Alper 1985), Papanicolau (Kruger,1986), Diff-Quick (Kruger, 1987) o Shorr (OMS, 1980).

Actualmente la clasificación de la Organización Mundial de la Salud, cuya última revisión es de 2010, está ampliamente aceptada en la mayoría de centros de Reproducción Asistida. Está basada en el criterio estricto desarrollado por Tygerberg que contempla como límite de los valores el 4% de espermatozoides de formas normales.

2.4.-Pruebas adicionales

Junto con el correcto diagnóstico de la calidad seminal de los pacientes , se han ido desarrollando otra serie de técnicas no invasivas que nos permiten obtener mas información y utilizarla como valores pronósticos del ciclo. Los análisis convencionales no nos revelan todos los aspectos de la función testicular y de la calidad espermática.

El estudio de la dotación cromosómica de los espermatozoides puede ser estudiada a nivel de diagnóstico, pues cargas seminales patológicas se han relacionado con bajas tasas de fecundación y embarazo, así como abortos recurrentes [33].

La detección de aneuploidias , por tanto, es causa de un gran porcentaje de casos de infertilidad. No solo en pacientes con muestras seminales patológicas, sino en muestras clasificadas como normales [34]. La utilización del análisis citogenético usando *Hibridación de fluorescencia in situ* (FISH) puede ayudarnos a averiguar las causas de la no consecución de embarazo.

El desarrollo del Diagnostico Genético Preimplantacional, con el análisis de blastómeras de los embriones generados en el laboratorio nos va a permitir transferir embriones cromosómicamente correctos, a pesar de haber sido generados con muestras seminales con FISH alterado.

Por otra parte, la integridad del genoma espermático puede verse afectada por diversos factores, tanto endógenos como exógenos, tales como el estilo de vida, el tabaco, alimentación, etc.

Las células somáticas disponen de varias formas de reparar el ADN dañado. Sin embargo, los gametos deben de mantener la integridad genómica, ya que alteraciones en la línea germinal serán heredadas por el embrión de la siguiente generación.

Se han desarrollado varias técnicas para la valoración de la integridad del ADN espermático: SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), SCD (Sperm Chromatin Dispersion), TUNEL (Tdt-mediated x-dUTP nick end labeling) y Comet. En todos los

estudios se calcula un índice de fragmentación espermático (IFE), que se ha relacionado con el pronóstico de gestación.

Desgraciadamente estas técnicas son de uso puramente diagnóstico ya que a día de hoy, cualquier estudio diagnóstico implica la destrucción de la célula analizada.

En cuanto a la fragmentación del ADN espermático, la técnica de MACS (Magnetic cell sorting) nos permite hacer una selección previa de espermatozoides con la integridad del ADN intacto. Es una técnica sencilla basada en pequeñas esferas magnéticas unidas a anticuerpos, que están dirigidas a antígenos específicos del espermatozoide, los cuales aparecen cuando este entra en apoptosis [35].

Dado que la alteración de la integridad del ADN espermático va a conllevar a la entrada en proceso de apoptosis por parte del espermatozoide, podremos separar los espermatozoides con el DNA intacto [36].

La separación final se realiza al hacer pasar una suspensión seminal a través de un campo magnético, en el que quedarán retenidos los complejos esfera-espermatozoide alterado.

3.-Generación embrionaria

Hoy en día, son dos técnicas las que se utilizan de rutina en los laboratorios de reproducción asistida: la Fecundación In Vitro convencional (FIV convencional), y la Microinyección Intracitoplasmática espermática (ICSI).

En ambas técnicas se parte de una estimulación ovárica con la que se promueve el crecimiento de varios folículos. El ciclo es controlado ecográficamente, y a través de una punción folicular ecoguiada se obtienen ovocitos, los cuales serán fecundados posteriormente en el laboratorio con una muestra seminal previamente procesada.

La FIV convencional se ha estado usando desde finales de los años 70, consiguiéndose buenas tasas embarazo [22]. Consiste en inseminar cada ovocito obtenido en la punción con aproximadamente 200.000 espermatozoides de buena movilidad y morfología.

Una vez en contacto, y en un medio de cultivo adecuado, se producirá la fecundación y la generación de un nuevo embrión.

La calidad seminal al realizar un tratamiento de FIV convencional se muestra decisiva para la consecución de la gestación. Riedel ya en 1989 propuso como concentración mínima para utilizar una FIV convencional de 5 millones de espermatozoides por mililitro con una buena movilidad y morfología. Valores por debajo se correlacionaban con un mal pronóstico de gestación [37].

Como se ha señalado antes, se han relacionado anomalías en la morfología de la cabeza espermática con disminución de la tasa de fecundación. Concretamente, una correcta morfología del acrosoma espermático, la cual permite atravesar el tracto femenino y realizar con éxito la reacción acrosómica con el óvulo, es primordial para el éxito de una FIV convencional.

La Microinyección espermática consiste en la selección espermática de un espermatozoide aislado y su introducción en un ovocito que se encuentre en el estadio de Metafase II. La técnica, desarrollada por Palermo, permite seleccionar espermatozoides morfológicamente normales, dentro de muestras de calidad seminal disminuida.

La microinyección espermática de los ovocitos se realiza en un microscopio invertido, de superficie calefactada, con micromanipuladores en los que se acoplan micropipetas Holding e ICSI, para la sujeción y microinyección del ovocito respectivamente

La selección morfológica de los espermatozoides ha sido también objeto de debate debido a la óptica utilizada. Hoffman en 1975 [38] desarrolló el contraste por modulación, basado en el aumento de dicho contraste utilizando un polarizador y un condensador que convierten los gradientes de fase en los especímenes observados en diferencias de la intensidad de la luz. Este tipo de visualización se aplicó a los microscopios invertidos utilizados en la técnica de ICSI permitiéndonos realizar una mejor selección en cuanto a la morfología espermática.

Esta técnica está indicada en casos de un factor masculino moderado o severo, bajas tasas de fecundación en ciclos anteriores de FIV convencional y en infertilidad inexplicada.

No sólo es posible tratar muestras seminales de baja calidad, sino infertilidades a causa de obstrucciones de conductos excretores seminales. Espermatozoides aislados pueden ser recuperados quirúrgicamente desde el epidídimo y los testículos. Si existe una inmovilidad total en los espermatozoides del epidídimo, debido a fibrosis epididimaria, igualmente se pueden recuperar desde el testículo. En este caso, se puede realizar una biopsia testicular (TESE) o bien una aspiración testicular. En estos casos, el uso de la Pentoxifilina como activador del ATP nos ayudara a realizar la selección espermatozoide, pues actuará sobre la motilidad, incrementándola [39].

3.1.-Fecundación y desarrollo embrionario

La fecundación, o singamia, es el proceso por el cual un gameto masculino y uno femenino se unen durante la reproducción sexual para crear un nuevo individuo con un genoma derivado de ambos progenitores.

Una vez se ha producido la reacción acrosómica se produce la fusión de las membranas celulares del espermatozoide y del ovocito y finalmente, se produce la activación de este último [40]. En la fusión entre ambas membranas se han descrito numerosas proteínas primordiales para que se produzca, tales como PH-30 [41], metaloproteínas de la familia de las ADAMs [42] o Izumo I, una inmunoglobulina tipo I de la superfamilia de las proteínas de membrana que esta ubicada en el acrosoma [43]. Se realizaron estudios con ratones deficientes en esta proteína, en los que se vió que eran incapaces de producir la fecundación por sí mismos, pero al realizar una Microinyección espermática si se producían embriones viables [44].

Por el contrario, es Juno, la proteína expresada en el ovocito, que se unirá a Izumo, con el resultado de la activación de la fusión membranal.

Una vez se ha producido la fusión espermatozoide-ovocito, la cabeza espermática se descondensa y se forma el Pronúcleo Masculino (PN).

Con la correcta activación ovocitaria, se reactiva la meiosis, lo cual llevará a la extrusión del corpúsculo polar (CP) y la formación del Pronúcleo femenino.

Una vez formados ambos pronúcleos migran juntos, aunque no se llega a producir una fusión. Se reordenan los precursores de los cuerpos nucleolares (CPN) o nucléolos, produciéndose una polarización de los mismos hacia el otro PN.

Por último, la desaparición de ambos pronúcleos coincide con el apareamiento genético de ambos gametos, activándose el desarrollo del nuevo organismo, el *cleavage* (división del embrión en dos células) del cigoto y la nueva división celular del embrión [45].

En Reproducción Asistida se observa si se ha producido una correcta fecundación entre las 10 y 20 horas después de haberse realizado la ICSI o FIV. En este lapso de tiempo, se deberían observar los dos Pronúcleos y los dos corpúsculos polares.

En los casos en los que no se ha producido fecundación, principalmente es debido a la falta de la activación ovocitaria. El rol prominente del incremento del Calcio durante este proceso ha propiciado el uso de ionóforos de Calcio en pacientes con fallos de fecundación previos [46]. Estudios sobre pacientes con muestras seminales patológicas y fallos de fecundación y el uso de estos ionóforos han dado como resultado numerosos éxitos en la consecución de la gestación [47].

Tanto las tasas de implantación embrionaria como las de gestación van a estar íntimamente asociadas a la calidad embrionaria. Así mismo, la correcta selección del embrión a transferir ha estado en discusión en los diferentes grupos de investigación.

Se han establecido diferentes clasificaciones con el fin de obtener una predictibilidad sobre el ciclo del paciente en estudio. Estas clasificaciones se basan en diferentes aspectos del desarrollo embrionario, no solo en cuanto a morfología sino también el aspecto temporal del mismo.

Por último, un aspecto crucial en el éxito del tratamiento es el día en el que se realiza la transferencia embrionaria.

Clásicamente, se han realizado transferencias en el día +2 y +3 del ciclo celular. Sin embargo, con el desarrollo de nuevos medios y técnicas de cultivo celular, existe una tendencia en realizar la transferencia en estadio de blastocisto.

Las ventajas de la transferencia de embriones en estadio de blastocisto son varias; mejor selección embrionaria, mejor sincronía entre el estadio embrionario y el ambiente uterino [48], y menor contractibilidad uterina en el momento de la transferencia [49].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.-Hipótesis y objetivos

Los parámetros que miden la calidad de una muestra seminal se han utilizado como análisis de rutina a la hora de estudiar los casos de infertilidad.

Sin embargo, en los últimos años, con el avance de la tecnología de la reproducción asistida, estos valores han perdido importancia real, y ha disminuido su estudio en profundidad.

Muchos son los estudios y clínicas que se limitan a realizar ICSI sin preguntarse realmente el porqué de la no consecución del embarazo y que probabilidades hay de éxito basándonos en estas alteraciones.

Con el desarrollo del cultivo largo se expone la carga genética contenida en el espermatozoide, datos que anteriormente, en cultivos con transferencia en día +2 y +3 no se contemplaban.

Nuestra hipótesis de partida será el estudio de la idoneidad del cultivo hasta estadio de blastocistos en pacientes con morfología espermática muy alterada ya que debería afectar al desarrollo embrionario.

Para ello:

- Seleccionaremos pacientes con morfologías espermáticas altamente patológicas, con menos de un 2% de morfologías normales según el criterio de Tygerberg (OMS 2010).
- Pacientes con patologías seminales serán estudiados según se haya realizado un cultivo con transferencia en día + 3 y +5.
- Estableceremos grupos controles, con muestras a priori normales.
- Patologías seminales accesorias, como azoospermias obstructivas y tasas de fragmentación alteradas serán objeto de nuestro estudio.

En este estudio se incluirán ciclos con óvulos propios, es decir la ovodonación no será valorada. Asimismo, ciclos en los que sea necesario realizar un Diagnóstico Genético Preimplantacional no serán objeto del presente estudio.

Además, se realizará un estudio estadístico en profundidad con el objetivo de generar un algoritmo que nos permita clasificar y pronosticar el resultado de un ciclo de reproducción asistida.

Estadísticamente, se realizará un estudio prospectivo no randomizado de pacientes que acudieron a nuestro centro entre los años 2012 y 2016, clasificándolos según la patología seminal presentada, y de los datos obtenidos en los respectivos ciclos realizados.

1.1.-Objetivos

1. Observar cómo afecta la morfología espermática al desarrollo embrionario en el cultivo en el laboratorio, estableciendo la mejor aproximación a la hora de realizar un tratamiento con muestras espermáticas muy alteradas.
2. En muestras con la calidad de la carga genética alterada (IFE) se realizará la técnica de MACS y se estudiará el desarrollo embrionario en el laboratorio.
3. Definir el día de transferencia embrionaria en pacientes diagnosticados de azoospermia obstructiva.
4. Con la definición de los objetivos anteriores llegar a determinar variables predictoras del resultado de un ciclo de IVF y diseñar un algoritmo pronóstico según los datos obtenidos en el laboratorio optimizando los ciclos de IVF para obtener los mejores resultados según la patología espermática de cada paciente.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.-Selección de casos

En el presente estudio se han seleccionado parejas que fueron sometidas a tratamientos de reproducción asistida en nuestra clínica, Ginefiv.

Durante el periodo de tiempo comprendido entre los años 2013 y 2016 pacientes con problemas reproductivos, fueron estudiadas en nuestra clínica, obteniéndose un diagnóstico en cuanto a su infertilidad.

Un total de 2261 ciclos de Fecundación in vitro fueron sometidos a estudio.

Previamente, estas pacientes fueron evaluadas ginecológicamente, y a su vez, su pareja fue sometida a varios test andrológicos en búsqueda de diferentes patologías.

Un primer seminograma, según los criterios de la OMS de 2010, en el cual se valoró la concentración, motilidad y morfología espermática, junto con un test de supervivencia espermática a las 24 horas y un REM (Recuperado Espermático Móvil), fueron las pruebas de rutina que se realizaron en todos nuestros pacientes a estudiar.

En determinados casos, tales como presencia de morfologías espermáticas muy alteradas, o fallos en ciclos previos, se indicó la realización de pruebas anexas, tales como la Fragmentación del ADN espermático y el estudio de FISH en espermatozoides.

Una vez se estimó que iba a realizar un tratamiento de Microinyección espermática, se produce una hiperestimulación ovárica en la paciente con el objetivo de obtener un número adecuado de ovocitos.

Estos ovocitos fueron recolectados en el laboratorio y, en conjunción con la muestra seminal, se generaron embriones. Estos embriones fueron sometidos a procesos de cultivo y selección tras lo cual se procedió a la realización de la transferencia embrionaria uterina.

El autor quiere exponer que, según la ley de reproducción asistida 14/2006, se aplica el termino “preembrión” como el embrión formado “in vitro” constituido por el grupo de células resultantes de la división progresiva del ovocito fecundado hasta el día 14 del ciclo celular. Sin embargo, en el presente estudio se utilizará el termino “embrión” para describir el mismo hecho.

2.-Estimulación ovárica

Desde el punto de vista ginecológico, se realizó una hiperestimulación ovárica con el objetivo de aumentar el crecimiento folicular, atendiendo a los protocolos de la clínica y las necesidades particularizadas de cada paciente.

Dependiendo de los valores indicativos de la reserva ovárica de cada paciente, estas se clasificaron en:

- Normorespondedoras
- Altas respondedoras
- Bajas respondedoras

En nuestra clínica, se utilizan tres pautas para la estimulación ovárica de la paciente:

- Pauta larga: Se utilizan agonistas de la GnRH. Esta pauta implica un refrenado ovárico previo a la regla que se inicia a los 21 días. La estimulación del ciclo se realiza con gonadotropinas una vez que comienza la siguiente menstruación. La ovulación se induce con hCG recombinante. Esta pauta se utilizó en pacientes normorespondedoras.

- Pauta corta: Se realiza con análogos de la GnRH. La administración comienza desde el primer día de regla. El tercer día se suplementado con gonadotropinas hasta la inducción de la ovulación. Esta pauta se uso en pacientes con baja reserva ovárica.
- Pauta multidosis: Se realiza con antagonistas, y comienza el segundo día del ciclo con la estimulación con gonadotropinas. Según el control ecográfico, cuando se visualizan folículos mayores de 13 mm, se adicionan los antagonistas hasta la inducción de la ovulación.

Independientemente de la pauta utilizada, la inducción de la ovulación siempre se realizó con 6500 UI de hCG recombinante cuando se observaban 3 folículos de al menos 17mm y 36 h después se llevó a cabo la punción ovárica en nuestro quirófano por la ginecóloga, apoyada por el equipo de quirófano de Ginefiv.

La fase lútea fue apoyada por progesterona vía vaginal, desde el día de a punción ovárica hasta 15 días después de la transferencia embrionaria, donde se procedió a realizar la medición de la subunidad β -HCG en sangre periférica, con el objetivo de confirmar la gestación.

Si el resultado fue positivo, las pacientes siguieron un control ecográfico de la gestación, hasta dos meses después de la transferencia, tras la cual se le dio el alta médica y se le derivó a su ginecólogo para el seguimiento del embarazo.

Si el resultado fuese negativo, la paciente abandonó la medicación, y 15 días después tuvo lugar una cita con nuestros especialistas para plantear un nuevo ciclo, bien con embriones criopreservados o desde el punto inicial si no quedasen embriones en nuestro banco.

3.-Valoración seminal

Todos los pacientes recogidos en este estudio fueron valorados a través de un seminograma y un test de supervivencia espermática.

Los pacientes tuvieron que cumplir una abstinencia sexual previa a la eyaculación de entre 2 y 4 días, y la muestra de eyaculado fue obtenida por masturbación, o bien, en caso de imposibilidad, a través de relaciones sexuales con un preservativo especial sin lubricante ni espermicida. (Quermed medical, Madrid)

La muestra se depositó en un frasco estéril, y fue entregado en el centro. Si fue obtenida en el domicilio del paciente se le indicó que debía traerla antes de que transcurriese una hora.

La muestra se valoró a temperatura ambiente, una vez licuefactada. En el caso de que no lo hiciese, se depositó en un bote estéril con quimiotripsina (Durviz, Madrid).

El eyaculado se procesó en una campana de flujo laminar vertical, manteniendo las máximas precauciones en cuanto a la esterilidad del proceso.

El análisis se pudo dividir en dos fases, teniendo en cuenta los tiempos, análisis in situ y análisis extemporáneo de la muestra seminal.

3.1.-Análisis in situ:

Se realizó una valoración del aspecto, olor y volumen del eyaculado. Para ello se utilizaron jeringas estériles desechables.

La medición del pH con tiras reactivas, nos puede indicar posibles patologías asociadas. Se utilizaron tiras pH Merk (Merk KGaA, Darmstad)

A continuación, se procedió a la valoración de los siguientes parámetros:

- **Motilidad espermática.** Para ello se tomaron 15 microlitros de muestra homogeneizada y se valoró en un microscopio invertido de campo claro. Se realizó una clasificación según su movilidad, ya sean espermatozoides Progresivos Rectilíneos, formas Progresivas No Rectilíneas, e Inmóviles.
- **Concentración espermática:** El conteo se realizó en un microscopio de campo claro Leica DM750 (Leica, Alemania). Para ello se obtuvieron 15 microlitros de muestra y se depositaron en una cámara Makler (Ilustración 1). Esta cámara nos permite conocer la concentración por mililitro, y por ende, la concentración total del eyaculado.

Consta de dos partes:

- **Zona de soporte:** En ella se deposita la muestra seminal homogeneizada.
- **Zona de conteo:** Se coloca sobre la zona de soporte, dejando un espacio de 10 micras entre ambos. La muestra se expande en la cámara, la cual tiene grabada una cuadrícula de 10x10.

La cámara una vez colocada en el microscopio, a un aumento de 20x, nos permitió realizar el conteo. Al realizar el conteo de todas las cuadrículas, obtuvimos la concentración en millones por mililitro.

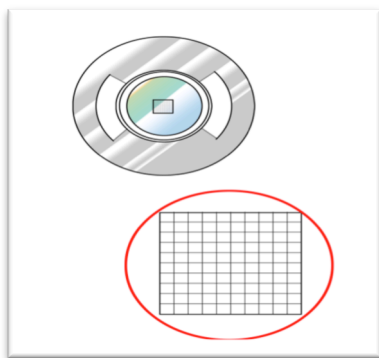
Si se multiplica por el volumen del eyaculado previamente calculado, se obtuvo entonces la concentración total espermática, la cual es representativa de la actividad funcional testicular.

- **Morfología espermática:** Se tomaron 15 microlitros de la muestra homogeneizada, y se realizó una extensión tipo frotis en un portaobjetos (Linealab, Madrid), dejándolo secar a temperatura ambiente. A continuación,

se procedió a la fijación de la muestras mediante un alcohol, y posterior tinción con panóptico (Panreac,Barcelona)(Ilustración2)(Imágenes 1-6)

- Vitalidad: Se realizó un test de Eosina-Nigrosina. Si la motilidad estaba disminuida, debíamos saber si el espermatozoide era viable o no. Aquellos espermatozoos que carezcan de vitalidad tienen la membrana celular dañada, dejando perfundir la eosina en su interior. El resto, por contraste, aparecen blancos en el microscopio de campo claro.
- Asimismo se valoró la presencia de células de descamación, aglutinaciones espermáticas y presencia de hematíes y leucocitos.

Se siguieron los criterios de la Organización Mundial de la Salud de 2010, y para ello, al menos se valoró una muestra seminal previa al ciclo de FIV, estimándose también la calidad de la muestra utilizada en el tratamiento.



Cada forma espermática en una cuadro, representa 100.000 por unidad de volumen, en este caso mililitro. Si únicamente se realiza el conteo en 10 cuadros, estos representan millones por unidad de volumen. Esta cámara también permite la valoración de la motilidad espermática.

Ilustración 1.-Camara Makler

- Test de supervivencia espermática: Con este parámetro se identificó la concentración de espermatozoides con buena morfología y movilidad. Para ello se realizó un REM (Recuperado espermático móvil), a través de un gradiente del 60% de densidad (Nidacon, Suecia) depositando 1 ml de semen homogeneizado. Por su diferente densidad, los espermatozoides de morfología normal atravesaron el gradiente al verse sometidos a un campo gravitatorio generado por una centrifuga (Kubota, Japón) a 1200 revoluciones por minuto durante un tiempo de 5 minutos. Se recogió el pellet generado y se sembró en una placa NUNC™

(Nunc,Dinamarca) con medio GAMETE™ (Vitrolife,Suecia) y recubierto de OVOIL™ (Vitrolife,Suecia). Se valoró la movilidad espermática a las 2 y 24 horas.

Criterios Morfológicos espermaticos según la OMS (2010)

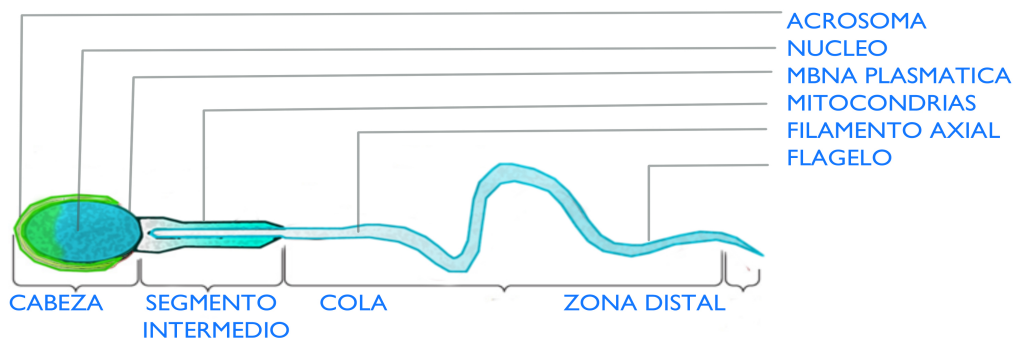


Ilustración 2.- Morfología espermática

La morfología espermática normal es definida por la OMS :

-La cabeza debe tener el contorno bien definido, con una región acrosomal del 40-70%. No mas de dos pequeñas vacuolas de mas del 20% del total. Región postacrosomal sin vacuolas. Tamaño de 4,1 micras de media, anchura de 2,8 micras.

-Zona intermedia homogénea y de la misma longitud que la cabeza. El eje debe estar alineado con la cabeza.

-Cola: calibre uniforme, 45 micras de largo. Puede estar parcialmente enrollada siempre que no parezca rota. Colas enrolladas pueden indicar disfunción epididimaria.

Debe hacerse hincapié en las siguientes alteraciones:

-Defectos en la cabeza: tamaño grande o pequeño, forma piriforme, redonda, amorfa y grandes vacuolas.

-Inserción asimétrica de la zona intermedia.

-Rotura de la cola, múltiples colas, tamaño corto, angulado,etc.

-Residuos citoplasmáticos: Es debido a una generación espermática alterada.

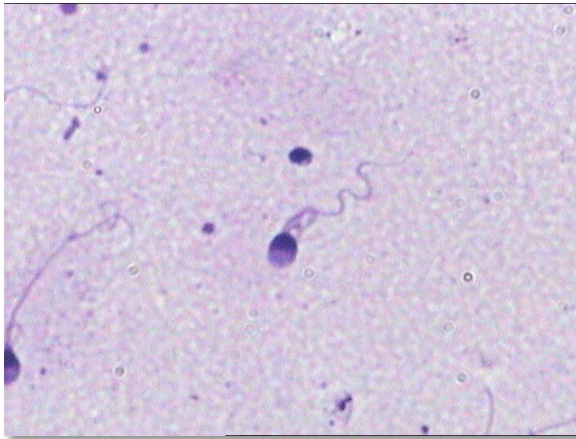


Imagen 1

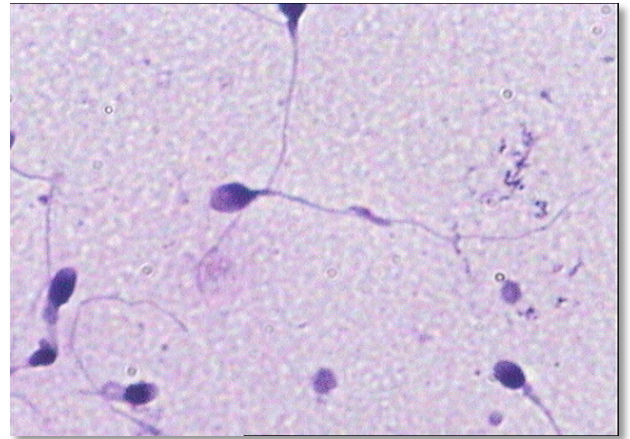


Imagen 2

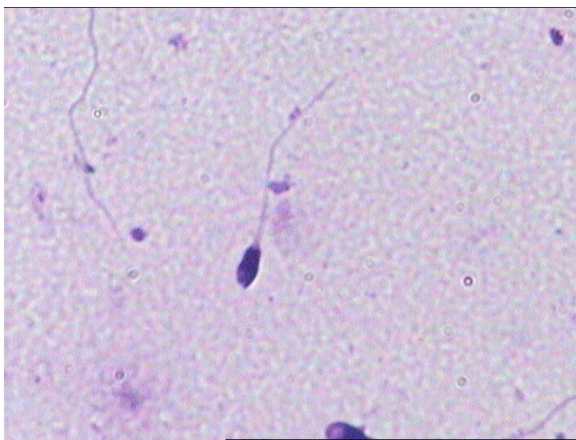


Imagen 3

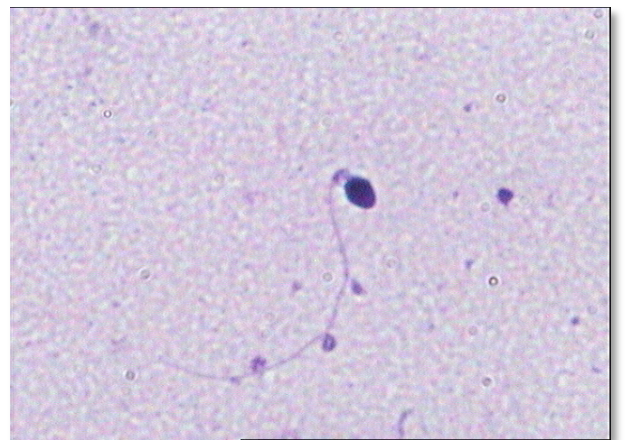


Imagen 4



Imagen 5

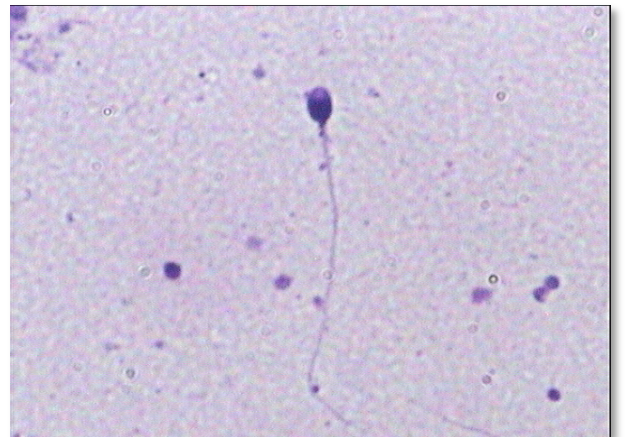


Imagen 6

Imágenes 1-6.-Tinciones morfológicas de espermatozoides 1-5: Espermatozoides morfológicamente alterados. 1.- Segmento intermedio engrosado. 2.- Espermatozoide vacuolado. 3.- Cabeza irregular. 4.-Inserción de la pieza intermedia alterada. 5.- Cola enrollada. 6.- Espermatozoide morfológicamente normal.

3.2.-Análisis extemporáneo

Una vez realizado el análisis, el resto del eyaculado se mantuvo 24 horas en su frasco estéril. Una vez transcurrido ese tiempo, se comprobó si había habido un crecimiento bacteriano, con la observación de 15 microlitros de muestra sobre un portaobjetos en el microscopio invertido.

Si apareció un crecimiento bacteriano, se informó al paciente, y se solicitó un cultivo seminal de una nueva muestra de eyaculado.

Si tras el cultivo seminal se identificó un crecimiento bacteriano, se comprobó el antibiograma generado, y se le propuso al paciente un tratamiento antibiótico específico. Una vez cumplido el protocolo de toma de dicho antibiótico, se repitió el cultivo seminal para la comprobación de la eliminación de la bacteria patógena.

El seminograma se repitió antes de comenzar el ciclo para corroborar los datos obtenidos. La muestra aportada el día del tratamiento se valoró de igual forma.

3.3.-Elección de tratamiento

Según los datos obtenidos de los parámetros a estudio, pudimos clasificar las muestras y maximizar su eficacia con el objetivo de discernir que tratamiento fuera el óptimo:

REM	MORFOLOGÍA	VITALIDAD 24HORAS	TECNICA RECOMENDADA
>5 mill/ml	>4%	Buena	IAH
	<4%	Mala	ICSI
3-5 mill/ml	>4%	Buena	FIV
	<4%	Mala	ICSI
<3 mill/ml	<4%		ICSI

3.4.-Datos obtenidos

Los datos obtenidos en la valoración seminal se clasificaron según el criterio de la OMS de 2010 y sus recomendaciones.

- **Concentración espermática:** La OMS clasifica una muestra como normal aquella que tiene mas de 15 millones de espermatozoides por mililitro, o bien mas de 39 millones por eyaculado.
- **Motilidad espermática:** Según este criterio, podemos categorizar los espermatozoides según:
 1. **Espermatozoides Progresivos (PR).** Son aquellos que tienen una movilidad activa, rectilínea o en grandes círculos.
 2. **Espermatozoides No Progresivos (NPR):** Aquellos que, aun siendo móviles, no presentan una movilidad activa.
 3. **Inmóviles (INM):** Aquellos que no progresan sobre si mismos.

La OMS clasifica como una muestra normal aquella que tiene mas del 32% de espermatozoides progresivos.

- **Morfología espermática:** Se utilizó el criterio estricto de Tygerberg, basado en la morfología estricta de Kruger, estableciendo la normalidad en un 4% de espermatozoides con morfología normal. Toda paciente de nuestro laboratorio fue sometido a un estricto control morfológico, para ello las extensiones son examinadas por 3 biólogos especialistas en andrología. Se realizó un conteaje de al menos 100 espermatozoides de la muestra previamente preparada.

Una vez realizado el frotis, se fijó con etanol al 90% durante 20 minutos, tras lo cual se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez fijados los espermatozoides al portaobjetos, se produjo el contraste, primero con Eosina durante 6 minutos y tras ella, Azur B, durante 2 minutos. (KIT Panóptico Panreac). A continuación, se eliminó el exceso de tinte con agua destilada, y se dejó secar.

La valoración y conteaje se realizó en microscopio Leica dm750 de campo claro a 100x con objetivo de inmersión y aceite. (Leica, Suiza)(Imágenes 1-6)

Así, atendiendo las recomendaciones propuestas por la OMS, podemos clasificar las muestras según las siguiente tablas:

	OMS 2010
Volumen	1,5 ml
Concentración	15 mill/ml 39 mill por eyaculado
Movilidad	32% PR
	40% PR+ NP
Morfología	>4%
Vitalidad	>58%

	DIAGNOSTICO
PARAMETROS NORMALES	NORMOZOOSPERMIA
BAJO VOLUMEN	HIPOSPERMIA
BAJA CONCENTRACION	OLIGOZOOSPERMIA
BAJA MOVILIDAD	ASTENOZOOSPERMIA
BAJA VITALIDAD	NECROZOOSPERMIA

3.5.-Fragmentación del ADN espermático

En aquellos pacientes que tuvieron un ciclo previo fallido, se le indicó la realización de una nueva prueba: la fragmentación del ADN espermático que nos cuantifica la integridad de la cadena de ADN. Esta fragmentación puede ser debida a causas endógenas: daño epididimario, aumento de ROS, etc.; o exógenas: estrés, estilo de vida, etc.

Para la valoración de este parámetro, se solicitó al paciente un tiempo de abstinencia sexual reducido, menor de 24 horas, para minimizar el efecto del aumento de la fragmentación debido a la permanencia espermática en el testículo. Además, se le pidió que la obtención de la muestra fuese en el centro, para disminuir el tiempo de procesamiento.

Actualmente, la valoración de la fragmentación se realiza por Citometría de Flujo, para lo cual se necesita una suspensión rica en espermatozoides.

Una vez obtenido el eyaculado, se realizó la cuantificación de la concentración

espermática, pues se necesita una concentración de 300.000 espermatozoides por mililitro. Se diluyen en TNE, un fijador, y se congela la muestra en el congelador a -4°C. (Liebherr,Alemania)

El procesamiento es realizado actualmente en colaboración con la Universidad de León, y nos remiten el resultado al centro. Se realizó por la técnica de SCSA (Sperm chromatin stability assessment), que se basa en la resistencia a la desnaturalización del ADN. Se estableció un índice de fragmentación del ADN (IFE), con el que se estimó el daño en el material genético de los espermatozoides. Los valores de referencia marcan la normalidad por debajo del 27% de espermatozoides fragmentados. (Ilustración 2)

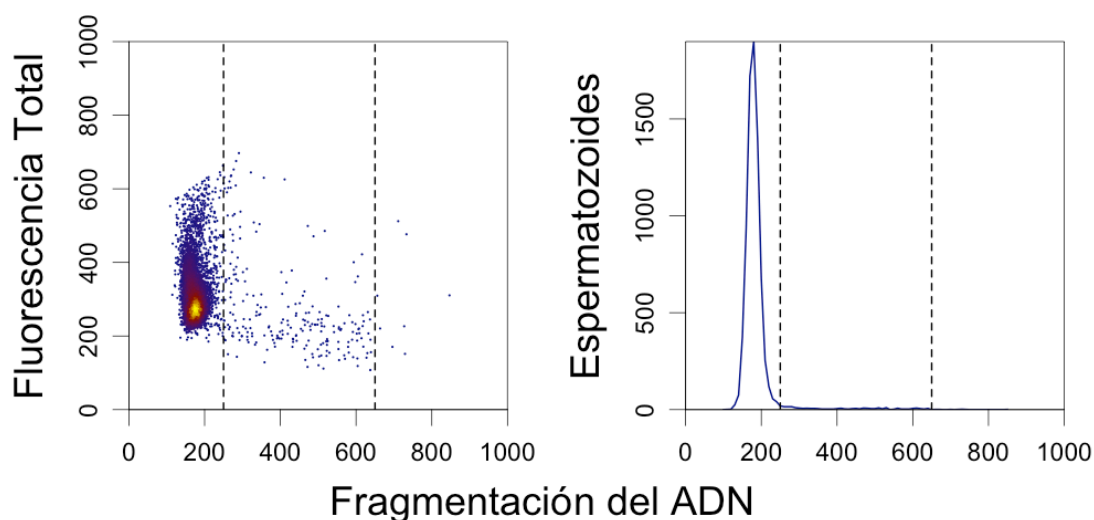


Ilustración 2.-Ejemplo de resultado de fragmentación de ADN espermático

3.6.-Pacientes Azoospermicos.

Cuando al valorar una muestra seminal no aparecían espermatozoides en eyaculado, se pudo sospechar de azoospermia. En ese caso, se tomó el volumen total de eyaculado, y se centrifugó a 3000 revoluciones por minuto durante 15 minutos. Se recuperó el concentrado, se preparó una extensión sobre un portaobjetos y se observó en un microscopio de campo claro a 40x.

Se realizó la valoración del pH y volumen de la misma forma que en la valoración de rutina.

En el caso de que no se observasen espermatozoides, se repitió el seminograma para confirmar el diagnóstico, y se ofreció al paciente pasar consulta urológica en nuestro centro.

Tras la valoración hormonal, FSH y testosterona, y la exploración física, el urólogo puede indicar la realización de una biopsia testicular.

Esta técnica también se indicó en pacientes vasectomizados que querían volver a utilizar su carga genética en un ciclo de Reproducción Asistida.

- Procedimiento quirúrgico. Se realizó en el quirófano, tras haberle explicado al paciente cómo es la intervención, y tras la firma de los consentimientos informados.

Se realizó una incisión en escroto, y se obtuvo tejido testicular. Se realizó bajo anestesia local, y una vez obtenido el tejido, se suturó. Tras la intervención el paciente pudo llevar vida normal.

- Procedimiento de laboratorio. El tejido fue disgregado con 2 portaobjetos estériles sobre una placa de cultivo Nunc (NUNC, Dinamarca). Una pequeña fracción se observó en el microscopio

invertido (Leica,Suiza) a 40x, buscando espermatozoides susceptibles de ser utilizados en tratamientos de FIV. El tejido, una vez fue disgregado, se lavó con medio de cultivo GAMETE™ (Vitrolife, Suecia) enriquecido con heparina (Hospira,Madrid), para evitar la posible formación de coágulos de sangre. A continuación, el tejido pudo ser utilizado en dos procesos:

1. Criopreservación para un posterior uso. La muestra lavada y procesada se fraccionó para poder realizar varios tratamientos de RA. Se empleó un medio crioprotector Spermfreeze™ (Fertipro,Belgica) con un volumen de 0,7 ml por cada ml de tejido a congelar. Se homogenizó el tejido con el crioprotector , y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Durante este tiempo, se formó una pastilla de nieve carbónica solida en un molde acoplado a una bombona de CO₂ (AIRLIQUIDE, Francia). Una vez pasado el tiempo de incubación, se depositaron gotas de tejido sobre la pastilla, generando píldoras que se introducen en un criotubo (NUNC 4,5 ml). Paralelamente, se depositaron varias píldoras en otro criotubo que se descongeló para realizar una prueba de descongelación. El criotubo a almacenar se introdujo en un banco de nitrógeno liquido (AIRLIQUIDE, Francia) anotando su localización.
2. Utilización de la muestra en fresco. La muestra fue lavado con medio IVF PLUS™ (Vitrolife, Suecia), y se dispuso en microgotas en una placa Nunc (Nunc, Dinamarca) recubierto de aceite mineral OVOIL™ (Vitrolife, Suecia) tras el cual se realizó la selección espermática para la ICSI.

4.-Preparación de muestras espermáticas

4.1.-Capacitación espermática

El día de la punción folicular se le solicitó al paciente que trajera una muestra seminal, que fue procesada y utilizada para el tratamiento.

La abstinencia sexual óptima fue de 36 horas, que es el período de tiempo que transcurrió desde la administración de la LH hasta la punción folicular.

Se realizó una valoración de la calidad seminal de igual forma que el seminograma, con los criterios de la OMS de 2010.

El procesamiento o capacitación seminal consistió en la obtención de una suspensión rica en espermatozoides de buena movilidad y morfología, y la separación de los factores decapacitantes que acompañan a los espermatozoides en el eyaculado. Estos factores van a impedir que los espermatozoides se activen y puedan fecundar al ovocito.

La capacitación espermática se realizó con gradientes de densidad: se prepararon gradientes al 40% y 80% de densidad utilizando el medio que se empleara las primeras horas de crecimiento embrionario, G-IVF PLUS™ (Vitrolife, Suecia) y el medio de densidad SPERMGRAD™ (Vitrolife, Suecia). Los gradientes se formaron con un volumen de 0,5 mililitros cada fase, depositando el mas denso en el fondo del tubo (Falcon, Suiza).

El medio de lavado había de estar gasificado al 6% de CO₂ y a una temperatura de 37 °C durante al menos 4 horas, y como máximo 12. Esto se consiguió manteniéndolo en un incubador Labotect (Labotect, Alemania) con las condiciones adecuadas.

El protocolo de capacitación de muestras fue el siguiente:

- Valoración de la muestra en microscopio invertido y conteo en cámara Makler.
- Depósito de la muestra seminal es un gradiente de densidad previamente preparado. Si el volumen del eyaculado excede de los 3 ml, se prepararon varios gradientes. Si la calidad seminal es muy baja, se realizó o bien un gradiente de menor volumen, o se omitió este paso, realizando únicamente un lavado con nuevo medio.
- Centrifugado de los gradientes a 1000 rpm durante 20 minutos.
- Recuperado del pellet con los espermatozoides que han migrado hacia el fondo del tubo, y se pasó a un nuevo tubo.
- Adición de medio de cultivo G-IVF PLUS™ (Vitrolife, Suiza) hasta 1 ml, homogenización y valoración del recuperado espermático.
- Centrifugado a 1400 rpm durante 5 minutos.
- Se retiró el medio y se añadió nuevo medio cuidadosamente, sin resuspender.

El objetivo de no resuspender en medio nuevo fue la realización de un “swim-up”, es decir, el aprovechamiento de la capacidad de movimiento de los espermatozoides. Estas células van a migrar por sí solas al medio enriquecido nuevo, de donde se podrán tomar para realizar la ICSI.

La muestra, ya capacitada, se almacenó en el incubador en el para su posterior uso.

4.2.-Preparación de muestras de baja calidad/biopsia testicular.

Cuando las muestras fueron clasificadas como factor masculino grave, con baja concentración espermática, no pudieron ser sometidas a gradientes de densidad. Esto fue debido a que la densidad de los gradientes no permitirían que el bajo

número de espermatozoides lo atravesasen.

En estos casos, el protocolo varió, procediendo de la siguiente manera:

- Valoración de la muestra seminal.
- Centrifugado a 1400 rpm durante 5 minutos.
- Separación del plasma seminal y adición de medio de cultivo IVF.
- Se depositan pequeñas microgotas en una placa NUNC (Nunc, Suecia) y se cubre de aceite mineral.

En esta placa se realizó la selección espermática con un microinyector para realizar la ICSI.

En el caso de muestras procedentes de biopsia testicular, o bien muestras con una movilidad muy disminuida, se utilizó Pentoxifilina (Sigma-Aldrich, Alemania).

La pentoxifilina es un inhibidor enzimático de la fosfodiesterasa, aumentando el AMPc intracelular, estimulando la actividad de la proteincinasa dependiente de AMPc que activa las mitocondrias presentes en el espermatozoide , con lo que se estimula la motilidad del mismo.

4.3.-Preparación de muestras criopreservadas.

Antes de iniciar el ciclo, y tras la valoración seminal, si el paciente informó de problemas en la obtención de la muestra, o bien no iba a poder traer una muestra el día de la punción, o bien su calidad estaba por debajo de la normalidad, se le recomendó criopreservar una muestra.

Actualmente el protocolo de Ginefiv realiza la capacitación de las muestras que van a ser criopreservadas. Así se minimiza la posibilidad de contaminación bacteriana en la muestra, ya que las bacterias seminales suelen estar presentes en el plasma

seminal, el cual se retira en una capacitación.

Las muestras fueron almacenadas en bancos de nitrógeno líquido, los cuales estaban conectados a un sistema de supervisión informatizado (VIGIE), que monitoriza la temperatura y avisa por correo electrónico y por teléfono móvil en el caso de cualquier variación de las mismas.

Las muestras se almacenan en criotubos NUNC especialmente diseñados para mantener sus características a -174°C .

Los pasos seguidos en una criopreservación seminal fueron los siguientes:

- Valoración seminal.
- Preparación de los gradientes de densidad, siguiendo los mismos pasos que en el protocolo de la capacitación espermática. En este caso no usaremos G-IVF PLUSTM, sino G-GAMETETM. (Vitrolife Suiza)
- Depósito de las muestras sobre los gradientes.
- Centrifugación a 1000 rpm durante 20 minutos.
- Lavado con nuevo medio G-GAMETETM.
- Centrifugación a 1400 rpm durante 5 minutos.
- Retirada de medio y adición de 1 ml de G-GAMETETM.
- Adición de crioprotector . SpermfreezeTM (0,7 ml por 1ml de muestra)
- Criopreservación en píldoras o en volumen neto según la necesidad del paciente.

La posterior descongelación de la muestra, se realizó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Al estar capacitada previamente, solo se realizó un lavado a 1400 rpm durante 5 minutos para retirar el crioprotector, tras lo cual se adicionó medio.

5.-Equipos y medios utilizados en el laboratorio de Andrología

- Campana de flujo laminar horizontal TELSTAR V-100 (Telstar, Barcelona). Zona de trabajo y capacitación de las muestras seminales.
- Campana de flujo laminar horizontal y Bioseguridad TELSTAR BIO II A (Telstar, Barcelona). Zona de procesamiento y capacitación de muestras con serologías positivas: HBV, HCV y HIV.
- Microscopio Invertido de campo claro LEICA (Leica Microsystems, Alemania). Valoración de motilidad y concentración espermática de las muestras a procesar.
- Microscopio de campo claro LEICA DMS750 (Leica Microsystems, Alemania). Valoración de extensiones de morfología espermática y concentración de muestras seminales de muy baja calidad.
- Centrifuga Kubota 3000 (Kubota Corp, Japón).
- Incubador C-200 (Labotect, Alemania), para el equilibrado de medios y mantenimiento de muestras.
- Contador LEUCOFORM (CRISON Instruments, Barcelona). Contaje de los diferentes aspectos morfológicos de los espermatozoides.
- Pipetas automáticas GILSON 20 y 100 microlitros (GILSON Ins, Middeltown). Para dispensar volúmenes conocidos de muestra seminal.
- Pipetas de cristal acopladas a sistemas de absorción. Para coger volúmenes de muestras y depositarlos en gradientes y lavados.
- Nevera THERMOLABIL (Liebherr, Alemania). Para el mantenimiento de los medios de cultivo y criopreservación.
- Bancos de almacenamiento de muestras de Nitrógeno Líquido. (Air Liquide Medicinal, S.L. Madrid)
- Sistema VIGIE, para el control y monitorización de temperaturas de nevera y bancos.
- Sistema informático GINEPAC (GEA systems, Madrid), propio de GINEFIV, para el control de datos y pacientes.

6.-Laboratorio de Fecundación In vitro(FIV)

Durante la punción folicular, los líquidos llegaron al laboratorio, donde, bajo una lupa estereoscópica, y en una campana de flujo, se fueron revisando los líquidos en busca de los ovocitos. Los tubos con líquido folicular se introdujeron en un bloque que mantiene la temperatura a 37°C, y uno a uno, se vertieron en placas Nunc (Nunc, Suecia). Con una pipeta estéril acoplada a un sistema se fueron tomando y dejando en una placa de 5 pocillos Nunc (Nunc,Suecia), la cual contenía G-IVF PLUS™ equilibrado y recubierto de OVOIL™.

Tras ser lavados de posibles restos hemáticos, la placa se guardó en el incubador. El incubador mantiene unas condiciones estables de temperatura, a 37°C, de CO₂, al 6%, y de humedad relativa, del 95%.

Los ovocitos, al ser recolectados, fueron clasificados según su aspecto de madurez. Si los complejos corona-ovocito presentaban compactación nos pudo indicar que no estaban en el estadio adecuado para la microinyección. Por tanto pudimos realizar una FIV convencional, si la muestra seminal nos lo permitía, teniendo una morfología, concentración y motilidad adecuada.

En el caso de que esto último no se cumpliera, o bien los ovocitos tuviesen aspecto de estar en el estadio adecuado, fueron decumulados.

En el presente estudio, al contemplarse los casos de morfología espermática gravemente alterada, solo se tuvieron en cuenta casos en que se hayan tenido que decumular los ovocitos. Por tanto, la FIV convencional no entró en nuestro estudio.

La decumulación se realizó de forma combinada: química y mecánica:

- Química: se pusieron en contacto con una dilución de Hialorunidasas- HYASE™, (Vitrolife Suiza).
- Mecánica: tras la química, se denudó mecánicamente con una stripper junto con sus capilares adecuados GYNETICS™ (150 y 135 Micras de diámetro).

Los ovocitos fueron revisados en el microscopio invertido para discriminar en qué estadio se encontraban:

- Metafase II: Es el estadio adecuado para que se produzca la fecundación. Se ha producido la extrusión del primer corpúsculo polar (CP) tras la metafase de la segunda división meiótica.
- Metafase I: No se ha producido la extrusión del CP. No se producirá la fecundación al introducir un espermatozoide por microinyección. Estos ovocitos permanecen en incubación, esperando que avancen al siguiente estadio en el laboratorio.
- Profase: Se observa la vesícula germinal al revisarlos en el microscopio. No evolucionaran en el laboratorio.

6.1.-Microinyección espermática (ICSI)

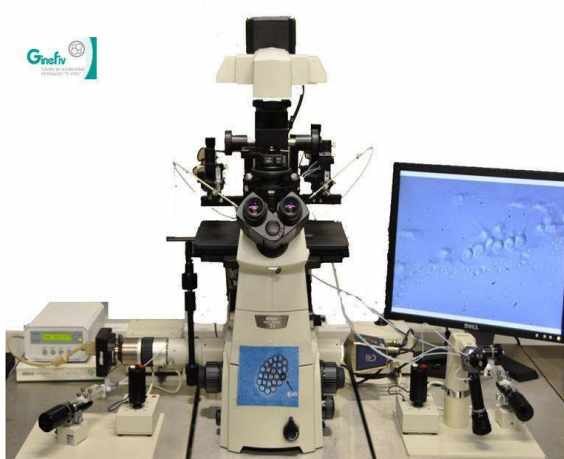
Se llevó a cabo en un microscopio invertido (Fotografía 1) el cual tiene acoplado dos micromanipuladores. Además, la superficie posee una placa de temperatura regulable, estando calibrada a 37°C.

Un micromanipulador se utilizó para la sujeción del ovocito a través de una pipeta (Holding), y el otro estaba preparado para la inmovilización de los espermatozoides (ICSI).(Fotografías 2,3 y 4). La selección espermática se realizó en una placa preparada para tal fin, con 2 microgotas de medio de alta densidad

(PVP™)(Vitrolife Suiza), que ayuda a ralentizar el movimiento de los espermatozoides. En dicha placa también hay microgotas de 20 microlitros de MOPS™ (Vitrolife, Suiza), donde se colocaron los ovocitos en el estadio adecuado para su inyección.

Esta placa estaba cubierta de aceite mineral OVOIL™ (Vitrolife, Suiza).

Tras la microinyección, los ovocitos se colocaron en una placa con medio de crecimiento G-1™ (Vitrolife, Suiza), y se mantienen en un estufa incubadora en el laboratorio.



Fotografía 1: Microscopio invertido para la realización de ICSI



Fotografías 2,3 y 4: Proceso de realización de la Microinyección espermática(ICSI)

6.2.-Fecundación y desarrollo embrionario.

Entre las 16 y las 20 horas post inyección, se comprobó la fecundación en el microscopio invertido. Además, los embriones se cambiaron de medio en una placa nueva con medio G1™ (Vitrolife, Suecia).

En este margen de tiempo, los embriones se podían encontrar en los siguientes estadios del desarrollo:

- Aparición de los 2 pronúcleos con sus nucléolos, y presencia de los 2 corpúsculos polares. Fecundación correcta.
- Aparición de 3 o más pronúcleos junto con los corpúsculos polares. Fecundación anómala, el embrión es desechado.
- Aparición de 2 corpúsculos polares y no observación de los pronúcleos. El embrión se mantiene en cultivo y se observa su evolución.
- Aparición de 1 corpúsculo polar y ningún pronúcleo. Se mantiene en cultivo, probablemente no se ha dado la fecundación.
- División celular temprana. El embrión es desechado.

Se utilizó la gradación pronuclear de Scott, que se basó en el número, disposición y tamaño de los pronúcleos y nucléolos. (Diagrama 1)

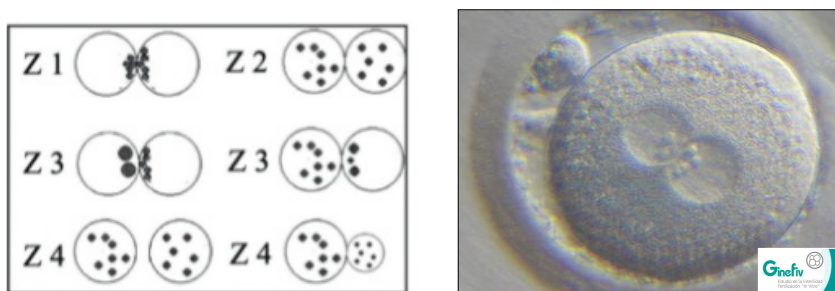


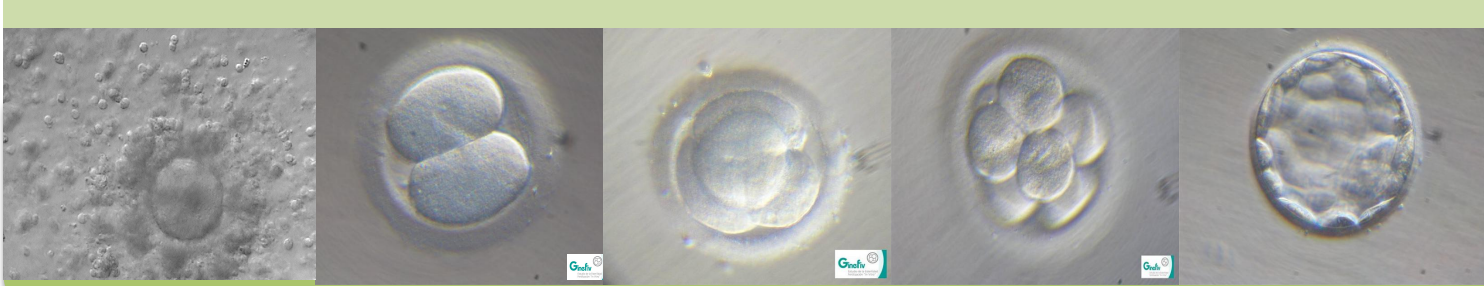
Diagrama 1.-Gradación pronuclear de Scott.- Imagen de los pronúcleos en el embrión fecundado.

Los embriones estuvieron en cultivo durante las siguientes horas y días. (Fotografías 5-10)

A las 44 horas de la microinyección se comprobó la duplicación celular, el número y simetría de las células, el número de núcleos por célula, la fragmentación y otros

parámetros que nos sirvieron para realizar una clasificación de la calidad de los embriones, lo cual está íntimamente relacionado con la tasa de gestación.

La selección del embrión, fue por tanto, uno de los factores críticos en el laboratorio.



Fotografías 5,6,7,8,9 y 10: Desarrollo embrionario: de ovocito a blastocisto

Los criterios a la hora de seleccionar los embriones se basan clásicamente en diferentes aspectos morfológicos. Según la variación y evolución de los mismos se clasificaron los embriones entre embriones viables, con potencial implantatorio, y los no viables, desechados posteriormente.

La clasificación embrionaria esta basada en:

- **Número de células:** Con el comienzo de la primera división celular, generándose dos células, hasta las sucesivas, se tienen en cuenta el número de las mismas según es estadio del desarrollo.
- **Tamaño celular:** Si las células son de tamaño similar o diferente. Lo ideal es que las divisiones sean simétricas.
- **Tipo de división:** Una célula debe dar lugar a dos células hijas mas pequeñas, pero la división puede ser errónea, de una sola célula pueden surgir un número mayor directamente. Debe ser una división sincrónica.
- **Nucleación celular:** Se tiene en cuenta el número de núcleos por célula del embrión.
- **Fragmentación:** Son vesículas citoplasmáticas, con membrana superficial y sin

núcleo La mayoría de los fragmentos se forman entre la etapa pronuclear y la segunda división celular. Si la fragmentación ocurre muy rápido –durante las primeras 24 horas- el pronóstico de evolución embrionaria empeora; así como si es muy abundante, ya que no sólo puede reducir la viabilidad del embrión, al verse reducido el volumen de citoplasma disponible para la normal división celular

Teniendo en cuenta el ciclo celular, el número de células, su tasa de división, número de núcleos, y presencia de fragmentación, a los embriones viables se les asignó una “calidad”.

Atendiendo a esta calidad y a la situación ginecológico de la paciente, se realizó la transferencia embrionaria de uno o dos embriones.

El resto de los embriones, atendiendo a la legislación vigente (ley de reproducción asistida 14/2006), fueron criopreservados para ciclos posteriores de transferencia embrionaria.

Se utilizó el criterio de ASEBIR para la clasificación embrionaria, tanto en el día +3(Diagrama 2), como si se ha decidido realizar un cultivo largo a estadio de blastocisto, en día + 5 o + 6. (Diagrama 3)

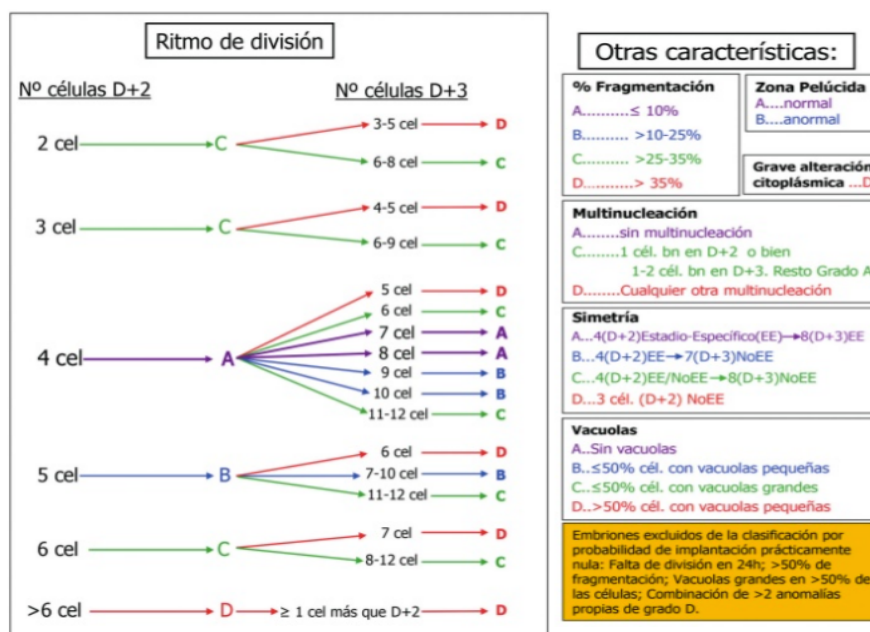


Diagrama 2.- Clasificación ASEBIR hasta el día +3.

En el caso del cultivo largo, en día + 3 se volvió a cambiar de placa a medio G2™ (Vitrolife, Suiza), y además, se utilizaron incubadores TRIGAS. Estos incubadores, no solo aportan el control de O₂ y CO₂, sino que también incluyen el N₂ para reducir la concentración de O₂ y conseguir condiciones de hipoxia.

D+4*	D+5			
	Grado de Expansión	MCI	TC	Catalogación ASEBIR
- Mórula: factor de buen pronóstico - ≥ 16 blastómeros no compactados: peor pronóstico	BEi BE BH BHi	A	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		B	A	B
			B	B
			C	C
			D	D
		C	A	C
			B	C
			C	C
			D	D
	BT o BC (ZP gruesa)		C	
	Mórula		D	
BT o BC	BEi BE BH BHi	A	A	B
			B	B
			C	C
			D	D
		B	A	B
			B	B
			C	C
			D	D
		C	A	C
			B	C
			C	C
			D	D
	BT o BC		D	

*En D+4 las mórulas compactadas mantienen la calidad de D+3.

Diagrama 3.-Casificación ASEBIR para el día +4, +5 y +6.

Por último, se seleccionarán los embriones que se transferirán a la paciente. El resto de embriones viables serán vitrificados y almacenados en los bancos de embriones de Ginefiv.

El proceso total del trabajo en el laboratorio de FIV se resumen en el siguiente diagrama de flujo (Diagrama 4):

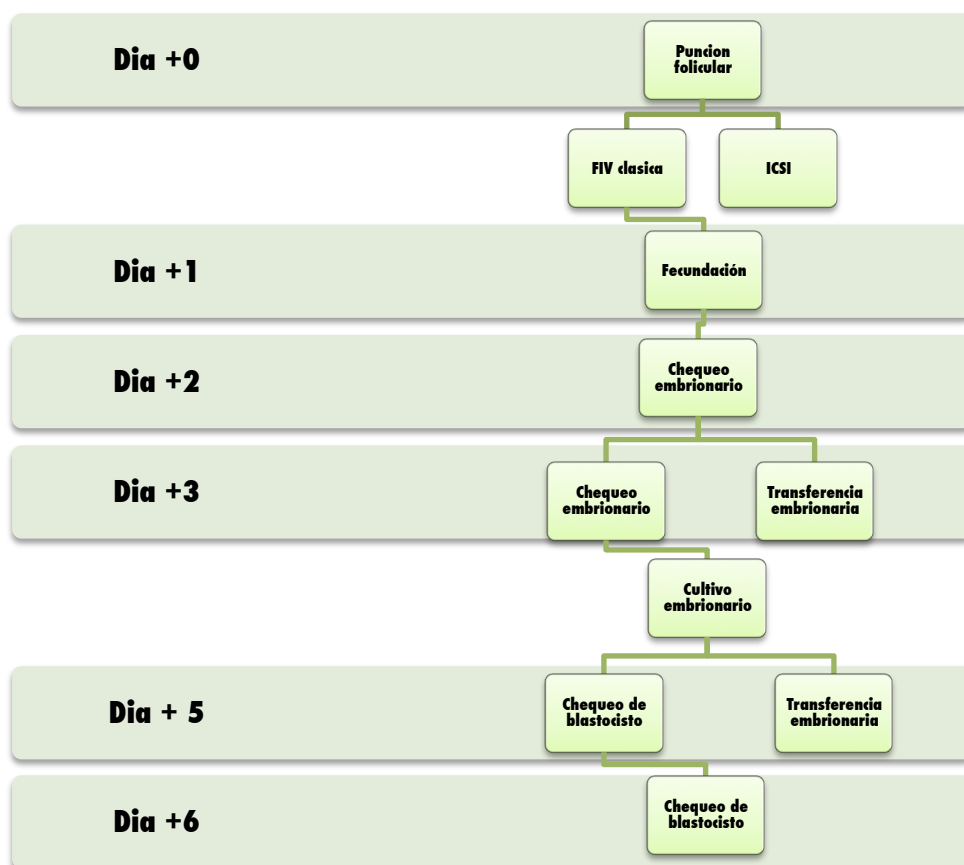


Diagrama 4.-Diagrama de flujo de trabajo en FIV

6.3.-Transferencia embrionaria

Una vez seleccionados los embriones que se transferirán, se pasaron a una placa de 5 pocillos (Nunc, Suiza), a la espera de que la paciente esté preparada.

Estos embriones se transfirieron en el día de la fase secretora adecuada, según su desarrollo celular (día +3 o día +5), con el correspondiente apoyo de la fase lútea.

Los pacientes acudieron a nuestra clínica con el único requisito de tener la vejiga llena, pues facilitará el acceso ecográfico por parte de la ginecóloga.

La transferencia se realizó bajo control ecográfico, empleando sondas de tipo flexible (Wallace 1816N) o rígido, (Gynetics 4220) según la facilidad de acceso al útero. Dicha sonda se purgó con medio de cultivo, y se colocaron los embriones en el extremo distal de dicha sonda.

Una vez realizada la transferencia, se purgó la sonda con el objetivo de verificar que los embriones no habían quedado dentro de ella.

Como ya se ha descrito, los embriones viables que no se transfieren fueron criopreservados mediante el proceso de la vitrificación.

Estos embriones podrán ser utilizados en ciclos posteriores de transferencia en donde la paciente no tendrá que ser sometida a una hiperestimulación ovárica controlada. En estos casos, se prepara el endometrio con un ciclo sustituido con estradiol desde el segundo día de ciclo. Se considero que el endometrio está preparado al observarse mediante ecografía vaginal 7 mm de grosor.

Por último, el autor desea especificar que en ningún caso se realizaron pruebas de análisis genético a los embriones generados. Esto entra en el campo del Diagnostico Genetico Preimplantacional. En el presente estudio se verificó la viabilidad embrionaria según el desarrollo en el laboratorio.

7.-Equipos y medios utilizados en el laboratorio de Fecundación In vitro(FIV)

- Campanas de flujo laminar vertical con superficie calefactada y control de CO₂ (K-Systems America) con doble puesto y lupas acopladas (Nikon Japón). Es la zona de trabajo donde se recuperan los ovocitos, se manipulan los embriones, se preparan para su transferencia y vitrificación.
- Incubador C-200 (Labotect,Alemania), para el equilibrado de medios y mantenimiento de muestras. Incubación de embriones y mantenimiento de su desarrollo.
- Incubador plano Ksystem G-185 (K-systems Kivex biotec, Dinamarca), para la realización de cultivo a blastocisto.
- Embryoscope (Vitrolife, Suecia). Para la monitorización del cultivo embrionario y realización de cultivo a blastocisto.
- Microscopios invertidos Nikon TE 2000S y Nikon Eclipse T1 (Nikon Corporation,Japón).
- Superficie calefactada tokai (Olympus corp, Japón).
- Microinyectores Nashirige (Nashirige corp, Japón).
- Pipetas automáticas Gilson 20 y 100 microlitros (GILSON Ins, Middeltown). Para dispensar volúmenes conocidos de medios de crecimiento, vitrificación y muestras seminales.
- Pipetas de cristal acopladas a sistemas de absorción. Para la captura de los cúmulos ovocito-corona.
- Stripper (Origio,Dinamarca) Utilizado en la decumulación ovocitaria y embrionaria en día +1 de Fiv Convencional.
- Filtros de Aire CODA (GEN X, USA).
- Bancos de almacenamiento de muestras de Nitrógeno Líquido. (Air Liquide Medicinal, S.L. Madrid)
- Sistema VIGIE , para el control y monitorización de temperaturas de nevera y bancos.
- Sistema informático GINEPAC(GEA systems, Madrid), propio de GINEFIV, para el control de datos y pacientes.

8.-Análisis estadístico

Una vez obtenidos los resultados de los ciclos contenidos en el periodo de tiempo estipulado, se realizó un análisis estadístico de los mismos.

Desde el punto de vista del laboratorio de andrología tuvimos en cuenta la calidad seminal, fragmentación del ADN espermático, FISH en espermatozoides y procedencia de dicha muestra.

En cuanto al desarrollo embrionario, se valoraron los ovocitos inseminados, el número de embriones correctamente fecundados y los diferentes parámetros que nos definen la calidad de los mismos.

Finalmente, y según el día de la transferencia, obtuvimos parámetros y tasas de llegada de los embriones a blastocisto.

Los grupos generados fueron estudiados desde el punto de vista de la normalidad estadística, utilizando el estadístico adecuado a cada población. Una vez determinada la normalidad o la ausencia de la misma, se realizaron estudios paramétricos y no paramétricos de comparación de medias y proporciones.

Con los datos obtenidos y el cálculo de tasas, se estableció un algoritmo que nos permita pronosticar la consecución de embarazo según los parámetros de los pacientes tales como edad, calidad seminal o número de ovocitos y embriones obtenidos. Además, se obtuvieron variables predictoras de un ciclo de Reproducción Asistida.

Para ello se realizó una estadística descriptiva y analítica de los parámetros estudiados a través del programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences-SPSS® versión 25 para Osx), apoyado por el programa propio de Ginefiv, Ginepac (Gea systems) y el paquete ofimático office de Microsoft para Osx.

RESULTADOS

I.-Datos obtenidos

En nuestro estudio se tomaron datos de ciclos realizados en la Clínica Ginefiv durante el periodo de tiempo comprendido entre los años 2013 y 2016.

Durante este período, los pacientes que iniciaron un ciclo de FIV se realizaron un seminograma completo con test de supervivencia espermático junto con el cálculo del REM. Los pacientes se clasificaron en dos grupos principales:

- Grupo A: Pacientes con morfología muy alterada. Los pacientes que integraron este grupo fueron aquellos en los que según el criterio de Tygerberg obtuvieron una clasificación menor o igual al 2% de formas normales.
- Grupo B: Pacientes con morfología normal. Estos pacientes obtuvieron un porcentaje de espermatozoides normales mayor al 4%.

No se tuvieron en cuenta otros parámetros como el volumen, concentración o motilidad espermática, pues nuestro objetivo es poner de manifiesto la importancia de la morfología espermática en el desarrollo embrionario.

Estos dos grupos a estudio se dividieron a su vez en dos subgrupos:

- Ciclos realizados con transferencia embrionaria en día +3 de ciclo.(A1 y B1)
- Ciclos realizados con transferencia embrionaria en día +5 de ciclo. (A2 y B2)

Dado que el cultivo con transferencia en estadio de blastocisto (día +5) se empezó a emplear de forma rutinaria en 2014, los datos se obtuvieron según a la temporalidad de la siguiente manera:

- Ciclos realizados en día +3 registrados entre 2013 y 2014.
- Ciclos realizados en día +5 registrados entre 2015 y 2016.

Esta distinción se realizó debido a que antes de 2015 el número de ciclos a estadio de blastocisto se realizaba de forma puntual, sin tener un criterio claro en cuanto a número de ovocitos debido a no disponer de la tecnología adecuada a este tipo de cultivo (incubadores trigas).

Tras la realización de un primer ciclo con resultado negativo, se amplía el estudio del varón, lo que resulta en la formación de un nuevo grupo (Grupo C) según el resultado del estudio de la fragmentación del ADN espermático: aquellos pacientes con un resultado del estudio alterado (IFE>27%) que en un nuevo ciclo se sometió la muestra seminal a la técnica de MACS, tanto en cultivo en día +3 como en día +5.

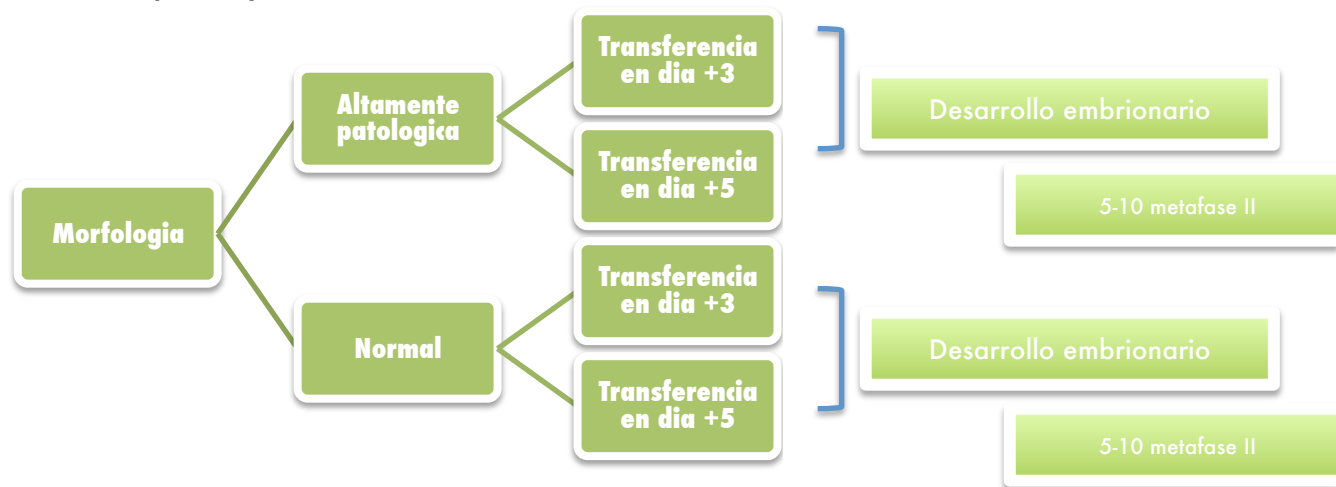
Por tanto, los nuevos grupos fueron:

- Pacientes con morfología espermática muy alterada junto con la fragmentación espermática igualmente alterada. Se realizó MACS. (+3/+5)
- Pacientes con morfología espermática dentro de los valores normales con fragmentación espermática alterada. Se realizó MACS. (+3/+5)

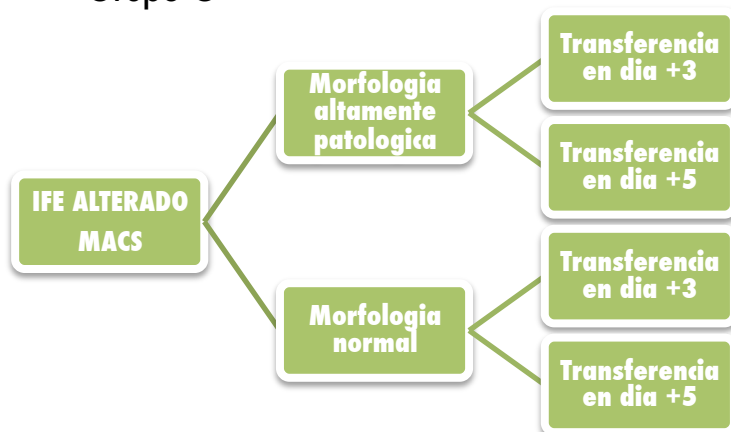
Por último, aquellos pacientes en los que tras el tratamiento con MACS siendo su fragmentación gravemente patológica no se consiguió el embarazo, se planteó la técnica de TESE.

Esta técnica se utilizó en pacientes con azoospermia obstructiva, observando el desarrollo embrionario tanto en transferencia en día +3 como en día +5. (Grupo D)

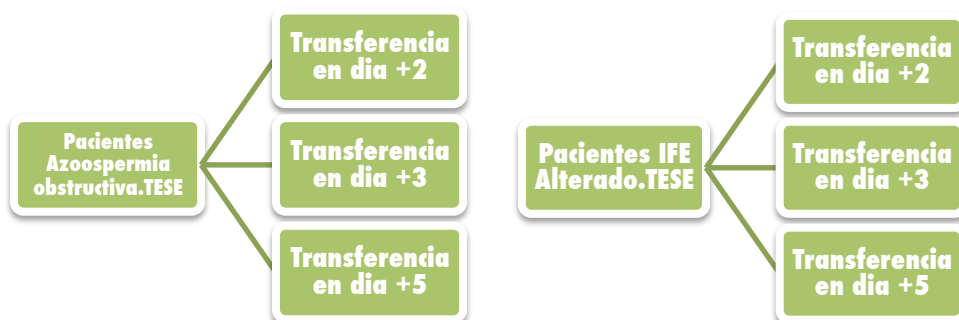
• Grupos A y B



• Grupo C



• Grupo D



2.-Estadística descriptiva de la población de estudio

De forma general nuestra población de estudio contempla 2261 ciclos, con una morfología espermática media de 3,35% de formas normales.

En cuanto a los datos obtenidos en las punciones foliculares realizadas, en ellas se obtuvo una media de 10,21 ovocitos por punción. De ellos, hubo fecundación correcta en una media de 6,30 ovocitos por cada punción folicular.

Por tanto, en el laboratorio se generaron un total de 8927 embriones, con diferentes gradaciones según el criterio de ASEBIR. Un 16,56 % de embriones fueron de calidad A, 33,56% de calidad B, 49% de calidad C y por último 0,86% de calidad D. (Tabla 1)

	Día +3	Día +5	Total
Ciclos totales	1299	962	2261
Edad de la paciente	36,47 ±3,972	36,69 ±4,012	
Ovocitos obtenidos	10661	12456	23117
Ovocitos fecundados	6377	8061	14438
Embriones	n %	n %	n %
Calidad A	957 -20,34%	519 -12,29%	1476 -16,53%
Calidad B	1700 -36,13%	1296 -30,69%	2996 -33,56%
Calidad C	1993 -42,35%	2382 -56,41%	4375 -49,00%
Calidad D	52 -1,10%	25 -0,59%	77 -0,86%
Embriones totales	4705	4222	8927

Tabla 1.-Descripción y porcentajes de la población a estudio.

Centrándonos en la clasificación embrionaria, se consideraron embriones de buena calidad aquellos que entraron en la categorización como A y B. Del total de embriones transferidos (3219), el 67,47% fueron de embriones de buena calidad. (Tabla 2)

	Día +3	Día +5	Total
Embriones transferidos	2232	987	3219
Transferencia A+B	1709 -67,13%	682-67,81%	67,47%
Tasa de implantación	31,94%	36.02%	33,98%

Tabla 2.-Calidad embrionaria de transferencia.

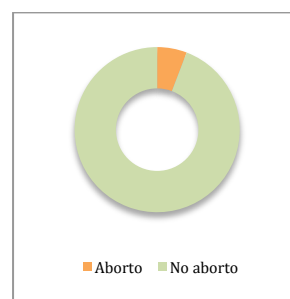
Por último, y centrándonos en las tasas indicativas de los procesos de reproducción asistida, se logró un porcentaje de fecundación embrionaria del 79,22%%. En cuanto a la tasa de gestación, se obtuvo un 45,77%, siendo la tasa de gestación evolutiva del 39,74%. Por tanto, un 6,03% de los embarazos no tuvieron una evolución favorable. (Tabla 3)

Tasa de fecundación	79,22%
Tasa de gestación	45,77%
(A+B)	51,63%
Tasa de gestación evolutiva	39,74%
(A+B)	44,26%
Tasa de aborto	6,03%

Tabla 3.-Tasas generales.



Gráfica 1.-Tasa de gestación evolutiva. Gráfica 2.-Gestación A+B.



Gráfica 3.-Tasa de aborto

En total, en el presente estudio, se clasificaron 1230 ciclos con morfología muy alterada (media de 1,56) y 1024 de morfología normal (media de 5,14).(Tabla 4)

	Media	Desviación típica	Nº de ciclos
Morfología patológica	1,56	±0,483	1230
Morfología Normal	5,14	±0,237	1032

Tabla 4-Datos morfológicos

El análisis estadístico de Kolmogorov-Smirnov o bien el de Shapiro wilk, según la dimensión de los grupos, determino que las poblaciones resultantes eran “no normales” en cuanto a su distribución.

Por tanto, para la realización de la comparación de las medias de los parámetros a estudio, se realizaron análisis no paramétricos de los subgrupos a estudio. Concretamente, se realizó el estudio mediante el estadístico de U de Mann-Whitney en el caso de comparación de medias, y el estadístico de χ^2 en el caso de la comparación de proporciones.

3.-Grupo de cultivo embrionario con transferencia en día +3

Un total de 1299 ciclos (57,45% de los casos) tuvieron una transferencia embrionaria en día +3. De ellos, se generaron 2 grupos según la morfología espermática: A1 con morfología alterada y B1 con morfología normal. (Tabla 5)

Día +3	Morfología patológica A1	Morfología normal B1
Número de ciclos	657	642

Tabla 5.-Grupos morfológicos

Se realizó un estudio comparativo entre los diferentes parámetros obtenidos en ambos grupos. En cuanto a la media de los ovocitos por ciclo, no aparecieron diferencias significativas entre ambos grupos ($8,11 \pm 1,56$ vs $8,32 \pm 3,72$). Ni en el número de ovocitos en metafase II, como en la media de ovocitos fecundados se observó significación estadística ($p < 0,05$) entre ambos grupos ($6,78 \pm 2,1$ vs $6,63 \pm 3,39$; $5,09 \pm 1,77$ vs $5,15 \pm 2,24$). (Tabla 6)

Refiriéndonos a las calidades embrionarias, al observar únicamente las medias de las distintas calidades no aparecieron diferencias demasiado evidentes, sin embargo estadísticamente si se reflejaron.

La calidad embrionaria A, en pacientes con teratozoospermia grave, nos brindó una media de 0,80 embriones por ciclo, frente a 0,75 del grupo de morfología normal.

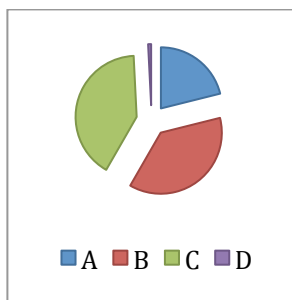
En cuanto a los embriones de gradación B, si se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) (1,41 frente a 1,31). La media de embriones de calidad C (1,55 vs 1,60) y D (0,03 vs 0,05) no nos dieron un resultado estadísticamente significativo.

La media de embriones fue mayor en el grupo de embriones con morfología muy alterada que en pacientes clasificados normales ($3,79 \pm 2,63$ vs $3,66 \pm 1,85$). Además, apareció significación estadística, corroborando estos datos. (Tabla 6)

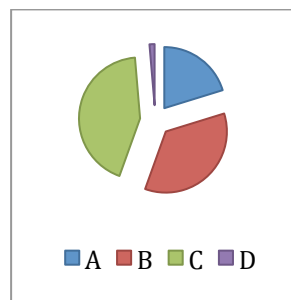
Respecto al número de embriones por transferencia, la media fue de $1,70 \pm 0,46$ frente a $1,70 \pm 0,495$, no revelando diferencias entre ambos grupos. Además, en un 49,01% de los casos se transfirió o transfirieron embriones de calidad A o B en el caso de muestras patológicas frente al 40,08% en muestras normales. Esto se corroboró de forma estadística. (Tabla 7)

	Morfología patológica A1		Morfología normal B1		Significación estadística
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	
Ovocitos obtenidos	8,11	$\pm 1,567$	1,32	$\pm 3,756$	0,545
Ovocitos metafase II	6,78	$\pm 2,105$	6,63	$\pm 3,395$	0,482
Ovocitos fecundados	5,09	$\pm 1,779$	5,15	$\pm 2,447$	0,0081
Embriones					
Calidad A	0,80	$\pm 0,944$	0,75	$\pm 0,958$	0,258
%	21,10%		20,49%		NA
Calidad B	1,41	$\pm 1,037$	1,31	$\pm 1,144$	0,026
%	37,20%		35,70%		NA
Calidad C	1,55	$\pm 1,174$	1,60	$\pm 1,304$	0,918
%	40,89%		43,71%		NA
Calidad D	0,03	$\pm 0,172$	0,05	$\pm 0,245$	0,438
%	0,93%		0,42%		NA
Embriones totales	3,79	$\pm 2,639$	3,66	$\pm 1,855$	0,046

Tabla 6.- Valores descriptivos del grupo con transferencia en +3



Grafica 4.-Porcentaje de calidad embrionaria Teratozoospermia día +3



Grafica 5.-Porcentaje de calidad embrionaria Buena morfología día +3

	Morfología patológica		Morfología normal		Significación estadística
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	
Embriones transferidos	1,74	±0,466	1,70	±0,495	0,107
Transferencia A+B	49,01%	NA	40,80%	NA	0,001
Tasa de implantación	30,07%	NA	33,81%	NA	0,067

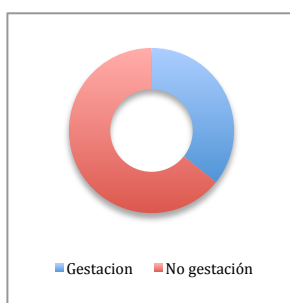
Tabla 7.- Datos de transferencia en +3

Por último, y aunque el valor absoluto de embriones fue superior en muestras teratozoospermicas, las tasas de fecundación y gestación fueron superiores en muestras normales. (Tasa de fecundación: 74,9% frente a 83,5%; tasa de gestación: 35,76% frente a 42,46%). ($p < 0,05$).

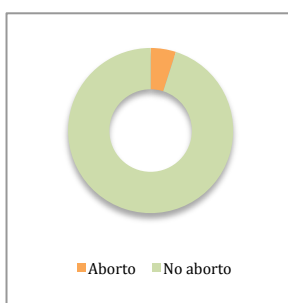
La tasa de embarazo evolutivo también fue menor en muestras seminales alteradas y fue demostrado por el análisis estadístico ($p = 0,041$) (Tabla 8).

	Morfología patológica A1	Morfología normal B1	Significación estadística
Tasa de fecundación	74,9%	83,5%	0,024
Tasa de gestación	35,76%	42,36%	0,000
(A+B)	41,61%	48,47%	0,001
Tasa de gestación evolutiva	32,5%	37,35%	0,041
(A+B)	38,8%	41,22%	0,047
Tasa de aborto	4,95%	4,44%	0,671
Tasa de cancelación	0,45%	0,15%	0,341
Tasa de no transferencia	1,67%	0,77%	0,023

Tabla 8.-Comparación de tasas entre ambos grupos



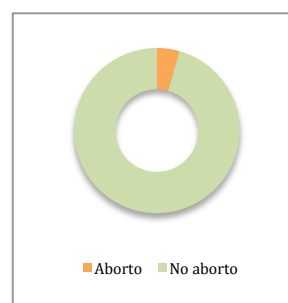
Grafica 6-
Gestación evolutiva teratozoospermia .



Grafica 7.-
Tasa de aborto teratozoospermia



Grafica 8.-
Gestación evolutiva buena morfología



Grafica 9.-
Tasa de aborto buena morfología

4.-Grupo de cultivo embrionario con transferencia en día +5

En nuestro estudio fueron 962 ciclos (42,65% del total) en los que se realizó el cultivo con transferencia en blastocisto. Se generaron dos subgrupos, uno con pacientes con morfología muy alterada (A2), con 573 casos; y otro con el parámetro de la morfología espermática por encima de la normalidad(B2).(Tabla 9)

Día +5	Morfología patológica A2	Morfología normal B2
Número de ciclos	573	389

Tabla 9.-Casos con cultivo largo

En primer lugar, se realizó un análisis estadístico de comparación de medias entre ambos subgrupos. Aunque el estudio descriptivo nos ofreció un conjunto de medias de valores similares, necesitamos corroborar que no haya diferencias de grupos de forma significativa.

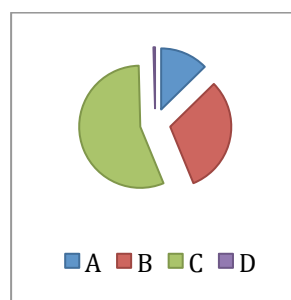
En cuanto a los ovocitos obtenidos en estos dos subgrupos, la media por ciclo fue muy similar ($12,92 \pm 5,59$ frente a $12,99 \pm 5,53$) sin que apareciese una significación estadística. De igual forma, la media de ovocitos en estadio de metafase II ($10,92 \pm 3,10$ vs $10,03 \pm 2,99$) y el número de embriones fecundados fue similar ($8,29 \pm 3,35$ frente a $8,51 \pm 0,462$), lo que nos indica que estamos ante una población homogénea. (Tabla 10)

	Morfología patológica A2		Morfología normal B2		Significación estadística
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	
Ovocitos obtenidos	12,92	±5,591	12,99	±5,538	0,060
Ovocitos metafase II	10,92	±3,107	10,03	±2,994	0,501
Ovocitos fecundados	8,29	±3,351	8,51	±3,392	0,462
Embriones					
Calidad A	0,50	±0,759	0,59	±0,925	0,356
%	15,57%		12,66%		NA
Calidad B	1,28	±1,155	1,45	±1,238	0,035
%	39,87%		31,11%		NA
Calidad C	1,89	±1,462	2,60	±1,766	0,012
%	56,37%		55,76%		NA
Calidad D	0,03	±0,175	0,02	±0,018	0,199
%	0,93%		0,42%		NA
Embriones totales	3,21	±1,886	4,66	±2,468	0,022

Tabla 10.-Valores descriptivos del grupo con transferencia en +5



Gráfica 4.-Porcentaje de calidad embrionaria Teratozoospermia día +5



Gráfica 5.-Porcentaje de calidad embrionaria Buena morfología día +5

En cuanto a la calidad embrionaria, si se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,035$) en cuanto a la media de embriones de calidad B ($1,28 \pm 1,15$ frente a $1,45 \pm 1,23$) y de calidad C ($2,39$ frente a $2,60$) siendo mayor en pacientes con buena morfología espermática.

Por último, refiriéndonos a la media de embriones totales, se puso de manifiesto la gran diferencia entre embriones procedentes de muestras con graves alteraciones en la morfología ($3,21 \pm 1,88$) frente al grupo de muestras con morfología normal ($4,66 \pm 2,46$), apareciendo además significación estadística ($p<0,05$)(Tabla 10).

En lo relativo a la media de embriones transferidos, en ambos casos la media es muy cercana a la transferencia del embrión único, no apreciando diferencias entre ambos grupos.

Por otra parte, en un 58,25% de los casos del grupo procedente de pacientes con alteraciones seminales se transfirieron embriones de buena calidad (A o B), siendo de 58,20% en el grupo de morfología espermática normal. (Tabla 11)

	Morfología patológica		Morfología normal		Significación estadística
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	
Embriones transferidos	1,04	±0,665	1,00	±0,702	0,107
Transferencia A+B	58,5%	NA	58,20%	NA	0,891
Tasa de implantación	38,04%	NA	37,51%	NA	0,472

Tabla 11.-Datos de transferencia en +5

En cuanto a la tasa de fecundación, ésta fue superior en muestras con morfología normal, con una diferencia del 7%. Además, el estudio de comparación de proporciones así nos lo reveló ($p < 0,05$). Sin embargo, la tasa de gestación fue muy similar en ambos grupos (52,72 vs 52,24), así como la tasa de embarazo clínico (44,4% frente a 46,71%). (Tabla12)

Si nos centramos en los embriones de buena calidad, los clasificados como A y B, la tasa de gestación fue también similar (58,25% frente a 58,20%). La misma situación se repitió en la tasa de embarazo evolutivo (48,90% y 48,18%).

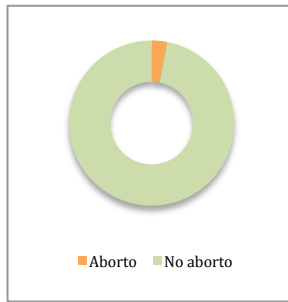
En ninguna de estas tasas apareció significación estadística, con lo que los grupos se comportaron igual. (Tabla 12)

	Morfología patológica A2	Morfología normal B2	Significación estadística
Tasa de fecundación	75,91%	82,6%	0,024
Tasa de gestación (A+B)	52,72%	52,24%	0,545
Tasa de gestación evolutiva (A+B)	58,25%	58,20%	0,948
Tasa de gestación evolutiva (A+B)	44,4%	46,71%	0,642
Tasa de aborto	48,90%	48,14%	0,893
Tasa de cancelación	3,08%	2,85%	0,260
No transferencia	2,61%	3,08%	0,019
	17,45%	22,36	0,022

Tabla 12.- Comparación de tasas entre ambos grupos



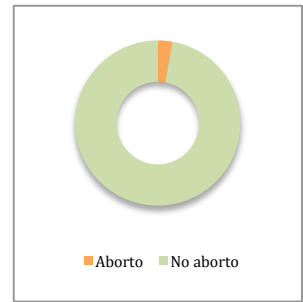
Grafica 10-
Gestación evolutiva teratozoospermia .



Grafica 11.-
Tasa de aborto teratozoospermia



Grafica 12-
Gestación evolutiva buena morfología



Grafica 13-
Tasa de aborto buena morfología

5.-Subgrupos por número de ovocitos en metafase II

Tras el estudio de los ciclos realizados en el centro, se puso de manifiesto la diferencia de medias entre los ovocitos obtenidos y embriones generados en el cultivo embrionario con transferencia en día +3 con respecto al cultivo a estadio de blastocisto (transferencia en día +5).

Dado que el número de embriones fecundados es uno de los criterios seguidos en nuestro laboratorio para la indicación de cultivo largo, apareció un número netamente superior de los mismos en los grupos con transferencia en +5 (5,09 y 5,015 en +3 vs 8,29 y 8,51 en +5), no se pudo realizar la una comparación válida por lo que se ajustaron las poblaciones a estudio.

Nuestro objetivo último fue poner de manifiesto la alteración grave de la morfología en relación al desarrollo embrionario, por lo que debíamos obtener poblaciones comparables.

Se generaron los siguientes subgrupos:

- Punciones con resultado entre 0 y 5 ovocitos en estadio de metafase II.
- Punciones con resultado entre 6 y 10 ovocitos en estadio de metafase II.
- Punciones con resultado de más de 10 ovocitos en estadio de metafase II.

Ambos subgrupos se dividieron a su vez en:

- Morfología gravemente alterada
- Morfología dentro de la normalidad

Una vez obtenidos los resultados de los ciclos se pudo observar que dado que el criterio de inclusión en el programa de cultivo largo fue tener una buena calidad embrionaria en el día +3 del desarrollo y un número mínimo de 4 embriones viables en el mismo día para realizar una comparación en la que quitásemos el sesgo debido al bajo número de ovocitos, así como una hiperrespuesta ovárica, ambos con una posible baja calidad ovocitaria, el estudio se debía centrar en el grupo de entre 6 y 10 ovocitos en metafase II. (Tabla 13 y tabla 14).

A continuación se realizó una comparación entre los grupos de mala morfología (día +3 vs día +5) y de morfología normal (día +3 y día +5). (Tabla 15 y tabla 16).

5.1-Transferencia en día +3

Cuando se obtuvieron entre 5 y 10 metafases II y se transfirió en día +3, pudimos observar que la media de ovocitos era muy similar en ambos grupos de pacientes ($8,55 \pm 1,17$ vs $8,37 \pm 1,19$), no existiendo diferencias significativas entre ellos. Por tanto fue un grupo homogéneo para su comparación. (Tabla 16)

En cuanto a ovocitos en estadio de metafase II y ovocitos fecundados nos encontramos en la misma situación, siendo las medias similares en ambos grupos. Fueron los resultados esperados al partir de una base de pacientes obtenidas de forma aleatoria.

6-10 ovocitos	Morfología patológica		Morfología normal		
DIA +3	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Significación estadística
Ciclos	424	NA	190		
Ovocitos obtenidos	8,55	±1,178	8,37	±1,192	0,071
Ovocitos metafase II	7,81	±1,564	7,70	±1,664	0,571
Ovocitos fecundados	6,03	±1,131	6,05	±1,133	0,290
Embriones					
Calidad A	0,96	±1,013	0,91	±1,048	0,390
Calidad B	1,67	±1,060	1,65	±1,077	0,911
Calidad C	1,73	±1,216	1,77	±1,279	0,792
Calidad D	0,02	±0,144	0,01	±0,102	0,356
Embriones totales	4,39	±1,517	4,15	±1,80,5	0,050
Tasas					
Tasa de gestación	35,14%	NA	47,89%	NA	0,025
Tasa de embarazo evolutivo	33,49%	NA	43,60%	NA	0,001
Tasa de aborto	4,87%	NA	4,76%	NA	0,781
Tasa de cancelación	1,05%	NA	0,23%	NA	0,002
No transferencia	0,23%	NA	1,05%	NA	0,031

Tabla 16.- Estadísticas del grupo 6-10 en día +3

Tras la realización del cultivo embrionario, al igual que en el grupo general (Tabla 8), la tasa de gestación fue muy superior en pacientes con muestras seminales morfológicamente normales. Esta diferencia no se observó a nivel de embriones conseguidos en el laboratorio, pero finalmente se reflejó en el resultado final.

En ninguno de los grupos de calidad embrionaria se puso de manifiesto la influencia de la morfología: en el grupo de embriones de calidad A se obtuvieron una media de 0,96 embriones por ciclo en pacientes con patología seminal, mientras que fue de 0,91 en el grupo normal. Con respecto a los embriones de categoría B, la diferencia (1,67 vs 1,65) no reflejo diferencias estadísticas. Por último, en el grupo de embriones C (1,73 vs 1,77) y D (0,02 vs 0,01) tampoco hubo diferencias apreciables. (Tabla 16)

Como se comentó con anterioridad, es en las tasas donde se puso de manifiesto la influencia de la morfología espermática. Tanto la tasa de gestación (35,14% vs 47,89%) como la de gestación evolutiva (33,49% vs 43,60%) fue muy superior en los ciclos generados con muestras morfológicamente normales. Además la diferencia entre tasas fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

5.2-Transferencia en día +5

Refiriéndonos a los ciclos transferidos en estadio de blastocisto con un número de metafases II entre 6 y 10 se obtuvieron los siguientes resultados. (Tabla 17)

6-10 ovocitos MII	Morfología patológica		Morfología normal		
DIA +5	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Significación estadística
Ciclos	221	NA	154		
Ovocitos obtenidos	8,59	$\pm 1,178$	8,66	$\pm 1,116$	0,607
Ovocitos metafase II	7,92	$\pm 2,872$	7,85	$\pm 3,021$	0,780
Ovocitos fecundados	6,27	$\pm 1,728$	6,63	$\pm 1,400$	0,062
Embriones					
Calidad A	0,42	$\pm 0,730$	0,54	$\pm 0,724$	0,041
Calidad B	0,95	$\pm 1,029$	1,22	$\pm 1,018$	0,452
Calidad C	2,07	$\pm 1,193$	2,29	$\pm 1,307$	0,149
Calidad D	0,01	$\pm 0,176$	0,02	$\pm 0,139$	0,471
Embriones totales	3,45	$\pm 1,621$	4,07	$\pm 1,644$	0,033
Tasas					
Tasa de gestación	53,92%	NA	56,33%	NA	0,063
Tasa de embarazo evolutivo	46,56%	NA	45,07%	NA	0,344
Tasa de aborto	3,29%	NA	3,12%	NA	0,415
Tasa de cancelación	2,26%	NA	1,94%	NA	0,082
No transferencia	5,42%	NA	4,54%	NA	0,004

Tabla 17.- Estadísticas del grupo 6-10 en día +5

El cuanto a la media de ovocitos fue muy similar en los grupos generados: $8,59 \pm 1,17$ en morfología alterada vs $8,66 \pm 1,11$ en el grupo de morfología normal,

no existiendo diferencias estadísticas entre ellos. De igual forma, el número de ovocitos en estadio de metafase II (7,92 vs 7,85) y el número de ovocitos fecundados (6,27 frente a 6,63) nos ofrecieron resultados homogéneos.

A diferencia de los ciclos con transferencia en día +3 se observaron diferencias significativas entre las calidades embrionarias. En ciclos con morfología patológica se obtuvieron una media de 0,42 embriones en blastocisto de calidad A, frente a una media de 0,54 en el subgrupo de morfología normal. Estos datos reflejaron diferencias estadísticas entre ellos. Por otra parte, la media de los embriones de categoría B ($0,95 \pm 1,02$ frente a $1,22 \pm 1,01$) y la media de embriones de categoría C ($2,07 \pm 1,19$ vs $2,29$) no ofrecieron diferencias entre ambos grupos. (Tabla 17)

Donde se manifestó la calidad seminal fue a nivel de número total de embriones: los embriones que se generaron con muestras seminales con alteraciones patológicas de la morfología espermática fueron de un número menor que los procedentes de morfologías normales. (3,45 embriones de media frente a 4,07 en muestras normales). Además, hubo resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

En cuanto a las tasas, ambos grupos se comportaron de forma homogénea. La tasa de gestación en el grupo de morfología patológica fue de 53,92% y la gestación clínica de 46,56%, mientras que en el segundo subgrupo fue de 56,33% la tasa de gestación y de 45,07% la tasa de gestación clínica. En cuanto a la tasa de cancelación fue similar, aunque la de no transferencia fue menor con morfología normal. (Tabla 17)

5.3-Comparación entre días de transferencia:

Con el fin de mostrar la influencia de la morfología espermática al desarrollo embrionario, se realizó una comparación estadística entre los subgrupos que se generaron: morfología patológica en día +3 y +5, y morfología normal en día +3 y +5.

Día +3 vs Día +5(6-10 MII)	Morfología patológica +3	Morfología patológica +5
Número de ciclos	424	221

	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Significación estadística
Ovocitos obtenidos	8,55	±1,178	8,59	±1,178	0,111
Ovocitos metafase II	7,81	±1,564	7,92	±2,872	0,230
Ovocitos fecundados	6,03	±1,131	6,27	±1,728	0,067
Embriones					
Calidad A	0,96	±1,013	0,42	±0,730	0,000
Calidad B	1,67	±1,060	0,95	±1,029	0,001
Calidad C	1,73	±1,216	2,07	±1,193	0,000
Calidad D	0,02	±0,144	0,01	±0,176	0,949
Embriones totales	4,39	±1,517	3,45	±1,621	0,023
Tasas					
Tasa de gestación	35,14%	NA	53,92%	NA	0,001
Tasa de embarazo evolutivo	33,49%	NA	46,56%	NA	0,003
Tasa de aborto	4,87%	NA	3,29%	NA	0,035

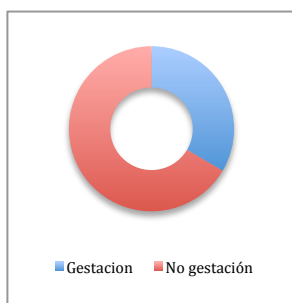
Tabla 18.- Comparación entre grupos de morfología alterada +3 vs +5

La media de ambos grupos fue homogénea, por tanto en ambos tipos de ciclo se partió de un número similar de ovocitos. (8,55 ovocitos por ciclo en día +3 frente a 8,59 en ciclos de cultivo largo). De igual forma, el número de ovocitos en metafase II (7,81 frente a 7,92) y el número de ovocitos fecundados (6,03 vs 6,27) fueron similares en ambos grupos.

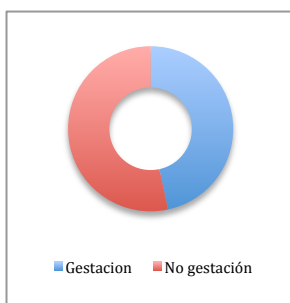
La distribución de los embriones en cuanto a calidad fue diferente según el tipo de cultivo al que se vieron sometidos. Los embriones de calidad A tuvieron una media mayor en cultivos en día +3 (0,96 ±1,013 por ciclo frente a 0,42 ±0,73), que en día +5, datos que se corroboraron estadísticamente. De igual forma, la categoría B fue mayor en día +3 (1,67 ±1,06) que en día +5 (0,95±1,02). Por el contrario hubo una media de embriones de calidad C mucho mayor en cultivo largo (1,73 ±1,21 día +3; 2,07 ±1,19 día +5) y una media de embriones de calidad D similar en ambos grupos. (Tabla 18)

Es en el número de embriones donde se refleja el cultivo largo: se obtuvieron una media de embriones netamente menor al realizar el cultivo largo en los pacientes con alteraciones seminales. (4,39 embriones por ciclo en día +3 frente a 3,45 en día +5)

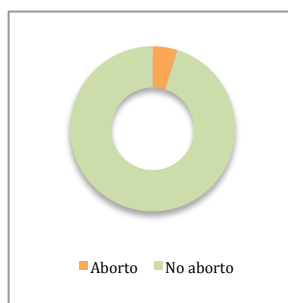
En cuanto a las tasas, es donde se puso de manifiesto la gran diferencia entre ambos grupos. Los ciclos en que se realizó cultivo largo con muestras gravemente alteradas tuvieron una tasa de gestación mucho mayor que en los que no. La tasa de gestación, de 53,92% frente a 35,14%, así como de gestación evolutiva, 46,56% frente a 33,49% así lo demostraron. (Grafica 8 y 9)



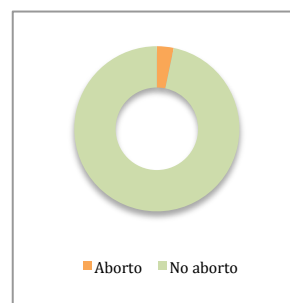
Grafica 14
Gestación evolutiva teratozoospermia +3



Grafica 15.-
Gestación evolutiva teratozoospermia +5



Grafica 16.-
Aborto teratozoospermia +3



Grafica 17.-
Abosto teratozoospermia+5

Al realizar la misma comparación de día +3 frente a día +5, pudimos observar que ambas poblaciones se comportaron de forma muy similar, al contrario que en muestras teratozoospermicas. (Tabla 18 y 19).

La media de los ovocitos en día +3 fue de $8,37 \pm 1,19$ y en +5 de $8,66 \pm 1,116$; con lo que partimos de muestras homogéneas y válidas para realizar la comparación. Lo mismo ocurrió en el número de ovocitos en metafase II (7,70 frente a 7,85), aunque el número de ovocitos fecundados fue ligeramente superior en día +5 ($6,05 \pm 1,13$ en día +3 frente a $6,63 \pm 1,40$ en día +5).

En cuanto a la distribución de las calidades embrionarias nos encontramos la misma situación que en el grupo de muestras teratozoospermicas: la media de embriones de calidad A y B es superior en transferencias en día +3, mientras que la calidad C es mayor en transferencias en estadio de blastocisto (Tabla 18).

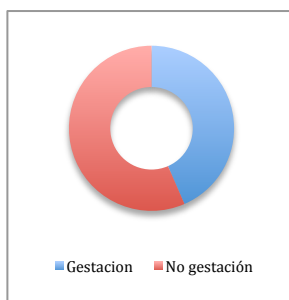
Sin embargo, y a diferencia del anterior grupo, el número de embriones es similar si transferimos en día +3 que en día +5. En este caso la selección embrionaria en cultivo es mucho menor, no existiendo diferencias significativas entre ambos tipos de cultivo.

Día +3 vs Día +5(6-10 MII)	Morfología normal +3	Morfología normal +5
Número de ciclos	190	154

	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Significación estadística
Ovocitos obtenidos	8,37	±1,192	8,66	±1,116	0,04
Ovocitos metafase II	7,70	±1,664	7,85	±3,021	0,420
Ovocitos fecundados	6,05	±1,133	6,63	±1,400	0,045
Embriones					
Calidad A	0,91	±1,048	0,54	±0,724	0,002
Calidad B	1,65	±1,077	1,22	±1,018	0,006
Calidad C	1,77	±1,279	2,29	±1,307	0,001
Calidad D	0,01	±0,102	0,02	±0,139	0,512
Embriones totales	4.15	±1,80,5	4,07	±1,644	0,121
Tasas					
Tasa de gestación	47,89%	NA	56,33%	NA	0,022
Tasa de gestación evolutiva	43,60%	NA	45,07%	NA	0,312
Tasa de aborto	4,76%	NA	3,12%	NA	0,001

Tabla 19- Comparación entre grupos de morfología normal +3 vs +5

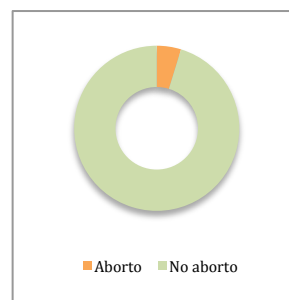
Por último, aunque la tasa de gestación es mayor en pacientes normozoospermicos con transferencia en día +5 ofreciendo diferencias significativas (56,33% día +5 frente a 47,89% en día +3), la gestación evolutiva no las ofreció (45,07% +5 frente a 43,70% +3).



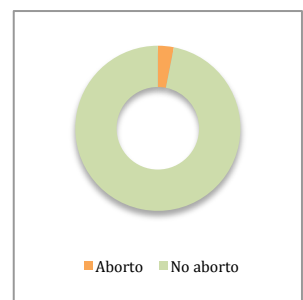
Grafica 18.- Gestación evolutiva morfología normal +5



Grafica 19.- Gestación evolutiva morfología normal +5



Grafica 20.- Aborto morfología normal +3



Grafica 21.- Abosto morfología normal+5

5.4-Grupos 0-5 ovocitos y más de 10 ovocitos obtenidos en punción

En cuanto a los otros dos grupos generados, dado que el número de ovocitos puede comprometer la comparación del desarrollo embrionario, a continuación se exponen los resultados que se obtuvieron.

0-5 ovocitos MII +3	Morfología patológica		Morfología normal		
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Significación estadística
Ovocitos fecundados	2,64	±1,150	2,26	1,191	0,061
Embriones totales	2,28	±0,974	2,03	±1,126	0,080
Tasa de gestación	25%	NA	30,07%	NA	0,001
Tasa de gestación evolutiva	22,2%	NA	22,37%	NA	0,541
Tasa de cancelación	2,77%	NA	0,69%	NA	0,001
Tasa de no transferencia	0%	NA	1,39%	NA	0,001

Tabla 20.-Descriptivo 0-5 ovocitos en día +3

0-5 ovocitos MII +5	Morfología patológica		Morfología normal		
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Significación estadística
Ovocitos fecundados	3,57	±1,568	2,73	±1,944	0,252
Embriones totales	2,29	±1,707	2,07	±1,642	0,485
Tasa de gestación	62,5%	NA	60%	NA	0,451
Tasa de gestación evolutiva	56,25%	NA	50%	NA	0,042
Tasa de cancelación	23,8%	NA	26,6%	NA	0,002
Tasa de no transferencia	4,76%	NA	0%	NA	0,001

Tabla 21.- Descriptivo 0-5 ovocitos día +5

En el caso de obtener un número reducido de ovocitos, aún manteniendo una tasa alta de gestación, se puede observar que la tasa de cancelación debido a la no obtención de embriones viables es muy alta (23,8% en morfología patológica y 26,6% en morfología normal) en el caso de ciclos en cultivo largo. Por otra parte, la tasa de que no se realice la transferencia por alteración endometrial se mantiene baja.

+10 ovocitos MII +3	Morfología patológica		Morfología normal		
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Significación estadística
Ovocitos fecundados	6,44	±1,647	7,08	±2,943	0,480
Embriones totales	4,78	±1,675	4,92	±1,681	0,707
Tasa de gestación	36,11%	NA	42,85%	NA	0,001
Tasa de gestación evolutiva	33,3%	NA	38,77%	NA	0,027
Tasa de cancelación	5,55%	NA	2,04%	NA	0,002
Tasa de no transferencia	13,88%	NA	14,28%	NA	0,612

+10 ovocitos MII +5	Morfología patológica		Morfología normal		
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Significación estadística
Ovocitos fecundados	9,73	±3,351	10,04	±3,471	0,326
Embriones totales	4,57	±1,929	5,21	±2,746	0,031
Tasa de gestación	50,59%	NA	47,55%	NA	0,531
Tasa de gestación evolutiva	42,63%	NA	37,70%	NA	0,034
Tasa de cancelación	1,99%	NA	0,69%	NA	0,002
Tasa de no transferencia	25,58%	NA	35,5%	NA	0,001

Como era de esperar, en los ciclos en los que se obtuvieron un número de ovocitos superior a 10, aparece una tasa de cancelación por no consecución de embriones viables para transferencia muy baja (1,99% y 0,69% en cultivo largo), pero a cambio, obtuvimos una tasa de no transferencia muy elevada. Esto es debido a la estimulación ovárica de la paciente, que no permitió la transferencia embrionaria en fresco.

6.-Pacientes con fragmentación del ADN espermático alterado

Tras la no consecución del embarazo se realizó un estudio adicional: la fragmentación de ADN espermático. Normalmente, es en un número muy reducido de pacientes en los que este parámetro aparece alterado. En los casos en los que el índice de fragmentación alterada (IFE) era superior al 27% se le prescribió al paciente un tratamiento con fármacos antioxidantes. Si tras la repetición del estudio los valores seguían por debajo de la normalidad, se les indicó un ciclo de FIV-ICSI con MACS. (Grupo C)

Se realizaron ciclos en día +3 y con transferencia en blastocisto, siendo en ambos casos pacientes con la morfología espermática muy alterada junto al índice de fragmentación igualmente alterado.

6.1- Ciclos con transferencia en día +3

En total, durante el período de nuestro estudio, se realizaron un total de 170 ciclos con la morfología espermática alterada en los que la tasa de fragmentación también estaba alterada. Por otra parte, hubo 44 ciclos en los que la muestra, aun siendo morfológicamente normal, si aparecía la tasa de fragmentación por encima de la normalidad.

Día +3 MACS	Morfología patológica C.A1	Morfología normal C.B1
Número de ciclos	170	44
Índice de fragmentación	29,12%	28,95%

En cuanto al número de ovocitos, se obtuvieron un número similar en ambos grupos ($7,27 \pm 2,82$ vs $6,68 \pm 4,05$) no observándose diferencias significativas. Aun así, el número ligeramente menor en el grupo de morfología normal se ve refrendado en el número de ovocitos fecundados, siendo menor también y demostrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). (Tabla 23)

	Morfología patológica		Morfología normal		Significación estadística
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	
Ovocitos obtenidos	7,27	$\pm 2,827$	6,68	$\pm 4,051$	0,264
Ovocitos metafase II	5,83	$\pm 1,732$	5,55	$\pm 2,323$	0,188
Ovocitos fecundados	3,62	$\pm 1,620$	3,23	$\pm 2,514$	0,040
Embriones					
Calidad A	0,43	$\pm 0,711$	0,23	$\pm 0,605$	0,028
Calidad B	0,90	$\pm 0,887$	0,82	$\pm 0,657$	0,923
Calidad C	0,95	$\pm 0,860$	0,91	$\pm 0,603$	0,854
Calidad D	0,15	$\pm 0,360$	0,0,05	$\pm 0,211$	0,066
Embriones totales	2,43	$\pm 1,131$	2,00	$\pm 1,258$	0,031
Tasas					
Tasa de gestación	37,64%	NA	36,36%	NA	0,566
Tasa de embarazo evolutivo	29,41%	NA	27,27%	NA	0,241
Tasa de aborto	1,17%	NA	2,54%	NA	0,001

Tabla 23.-Estadística descriptiva MACS día +3

Cuando observábamos la calidad de los embriones obtenidos, también se reflejó una calidad muy similar entre ambos grupos. Sin embargo, si se reflejó un número menor de ovocitos de calidad A en pacientes con morfología normal ($0,43 \pm 0,71$ vs $0,23 \pm 0,06$) ($p = 0,028$), lo cual, como consecuencia, nos llevo a obtener una media de embriones menor en total en estos pacientes.

Si nos referimos a las tasas, se pone de manifiesto que no existen diferencias significativas entre ambos grupos de estudio. El criterio de una morfología muy alterada, una vez se realizó el MACS no reflejó una diferencia acusada.

Tanto la tasa de gestación (37,64% vs 36,36%) como la de embarazo evolutivo (29,41% vs 27,27%) no reflejaron diferencias entre sí. (Tabla 23)

6.2.-Ciclos con transferencia en + 5

El número de ciclos en que se realizó cultivo largo con la técnica de MACS fue mucho menor que en los que se realizó el cultivo en +3.

Sin embargo, si nos ofreció datos interesantes para nuestro estudio (Tabla 24).

Día +5 MACS	Morfología patológica C.A2	Morfología normal C.B2
Número de ciclos	46	32
Índice de fragmentación	30,01%	29,72%

La media de ovocitos obtenidos fue mayor en los ciclos en los que se realizó la transferencia en día +3, pese a lo cual, como se comentó con anterioridad, un número adecuado de embriones es indicativo para la recomendación del cultivo hasta estadio de blastocisto.

Aun en estos términos, tanto la media de ovocitos obtenidos, como en estadio de metafase II y embriones correctamente fecundados fue mayor en el grupo de transferencia en día +3.

Estos datos se reflejan tanto en el número de embriones como en la calidad de los mismos, siendo el número de embriones por ciclo mayor en los pacientes con morfología patológica ($3,74 \pm 2,03$ morfología alterada frente a $2,06 \pm 1,77$ morfología normal).

En cuanto a la categorización embrionaria, solo aparecieron diferencias significativas en los embriones de calidad C ($2,15 \pm 1,59$ embriones por ciclo en morfología alterada frente a $0,94 \pm 0,84$ en morfología normal), debido probablemente a la diferencia de embriones totales. El resto de categorías, aun no siendo similares sus medias, no reflejaron un criterio estadístico de diferencia de grupos. (Tabla 24)

	Morfología patológica		Morfología normal		Significación estadística
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	
Ovocitos obtenidos	13,20	±4,059	9,50	±4,711	0,002
Ovocitos metafase II	11,02	±2,721	6,99	±4,215	0,005
Ovocitos fecundados	7,39	±2,863	4,50	±2,640	0,000
Embriones					
Calidad A	0,41	±0,686	0,19	±0,286	0,077
Calidad B	1,09	±1,170	0,69	±1,176	0,070
Calidad C	2,15	±1,591	0,94	±0,840	0,000
Calidad D	0,09	±0,285	0,25	±0,440	0,051
Embriones totales	3,74	±2,038	2,06	±1,777	0,000
Tasas					
Tasa de gestación	52,17%	NA	50%	NA	0,451
Tasa de embarazo evolutivo	39,13%	NA	37,55%	NA	0,222
Tasa de aborto	4,34%	NA	3,12%	NA	0,002

Tabla 24.-Estadística descriptiva MACS día +5

Por último, si nos centramos en las tasas, tanto la de gestación, como gestación evolutiva y de aborto resultaron en valores muy similares. La tasa de gestación en pacientes con morfología alterada, de 52,17%, y la de gestación evolutiva de 39,13% no ofrecieron diferencias significativas frente al grupo de morfología normal (50% y 37,55% respectivamente). (Tabla 24)

7.-Pacientes sometidos a TESE

Se realizaron un total de 145 ciclos de FIV mediante ICSI donde se utilizando muestra seminal procedente de biopsia testicular. Estos ciclos se han realizado en nuestra clínica, GINEFIV, durante el período de tiempo comprendido entre el año 2014 y 2016. (Grupo D)

Esta intervención había sido indicada en procesos obstructivos, es decir, previamente los pacientes habían sido diagnosticados como azoospermicos en seminogramas previos.

Tras la consulta urológica, en la cual se valoran los perfiles hormonales y seminales, se le indicó al paciente la realización de TESE con criopreservacion espermática.

Por tanto, todas las muestras sometidas a estudio han sido valoradas tras la biopsia testicular y criopreservadas, descongelándose una alícuota una vez realizada la punción folicular.

Se generaron 3 subgrupos de estudio, dependiendo del día de transferencia embrionaria: transferencia en día +2, en día +3 y día +5.

En nuestro laboratorio según protocolos previos, se contemplaba la transferencia en día + 2 en pacientes con únicamente 2 embriones fecundados, por lo que se ha tenido en cuenta en este estudio

Para asegurarnos un criterio estadístico que nos corrobore las diferencias observadas en las medias, realizaremos una prueba estadística entre los 3 subgrupos a estudiar.

Una vez realizado el contraste, observamos que los 3 subgrupos no son homogéneos en cuanto a la media de ovocitos obtenidos y de ovocitos en estadio de metafase II. (Tabla 25)

En cuanto al grupo de transferencia en día +2 y +3 no aparecen diferencias en las medias en ambos parámetros ($p=0,008$). (Tabla 26 y 27)

Por último, el grupo que tuvo transferencia embrionaria en día +5 tiene una media de ovocitos obtenidos y en estadio de metafase II superior a los otros 2 subgrupos.

RESULTADOS

Grupo de TESE	de	Transferencia en +2	Transferencia en +3	Transferencia en +5
Número de ciclos		47	56	16

Ovocitos obtenidos	7,85±3,93	9,96±4,225	17,06±7,912
Ovocitos metafase II	6,14±3,67	9,14±4,11	12,87±1,872
Ovocitos fecundados	1,83±1,147	4,46±2,157	7,13±4,334
Embriones			
Calidad A	0,19±0,495	0,46±0,631	0,53±0,990
%	6,3%	13,63%	12,69%
Calidad B	0,51±0,688	0,88±0,974	0,88±0,719
%	26,66%	31,81%	22,22%
Calidad C	0,98±0,794	1,27±1,395	2,50±2,449
%	51,11%	46,10%	63,49%
Calidad D	0,23±0,476	0,14±0,353	0,13±0,500
%	12,22%	5,19%	3,17%
Embriones totales	1,91±1,018	2,75±1,919	3,94±3,94
%	27,10%	46,38%	18,97%

Tabla 25.-Datos descriptivos de TESE

Comparación de medias N°Ovos	Día +2	Día +3	Día +5
+2	NA	0,08	0,000*
+3	0,08	NA	0,000*
+5	0,000*	0,000*	NA

Tabla 26.-Estadística de media de ovocitos por ciclo.

Comparación de medias N°Meta II	Día +2	Día +3	Día +5
+2	NA	0,08	0,000*
+3	0,12	NA	0,000*
+5	0,000*	0,000*	NA

Tabla 27.-Estadística de media de ovocitos en metafase II por ciclo

En cuanto al número de embriones fecundados, sí aparecen diferencias entre el número de ovocitos fecundados en los 3 grupos: 1,89±1,14 embriones en día +2, frente a 4,46±2,157 en día +3; 7 y 13±4,33 en día +5.

Estadísticamente, hay diferencias significativas entre los 3 grupos de estudio. Al realizar la comparación de medias, aparece que en día +5 el número de ovocitos fecundados es mayor que el resto de grupos, siendo este un criterio de inclusión en el protocolo de transferencia en día +5. (Tabla 28)

Comparación de medias ovos fecundados	Día +2	Día +3	Día +5
+2	NA	0,000*	0,000*
+3	0,000*	NA	0,008*
+5	0,000*	0,008*	NA

Tabla 28.-Estadística de ovocitos fecundados

Refiriéndonos a la media de embriones de calidad A obtenidos por ciclo se pone de manifiesto que la media es mayor en el grupo de transferencia de día +5 , $0,53 \pm 0,25$; mientras que en + 2 es de $0,19 \pm 0,072$, en +3 es de $0,46 \pm 0,08$. (Tabla 25)

Sí que aparecen diferencias significativas entre +2 frente al grupo +3 y +5, no existiendo diferencias entre estos dos últimos. (Tabla 29)

Comparación de medias	Día +2	Día +3	Día +5
+2	NA	0,006*	0,000*
+3	0,006*	NA	0,616
+5	0,000*	0,616	NA

Tabla 29.-Estadística de embriones de calidad A

El mayor número de embriones de calidad B se encuentran en el grupo de transferencia en día +3 porcentualmente (31,81% frente a 26,66% en día + 2 y 22,22% en día + 5). Sin embargo, la media de los embriones por ciclo fue exactamente la misma en día +3 y día +5 ($0,88 \pm 0,18$) y mayor que en el otro subgrupo: 0,51 en día +2. (Tabla 25)

Estadísticamente, las media del número de embriones entre el grupo +3 y + 5 no aparecen diferencias significativas entre sí. (Tabla 30)

Comparación de medias	Día +2	Día +3	Día +5
+2	NA	0,060	0,060
+3	0,060	NA	0,718
+5	0,060	0,718	NA

Tabla 30.-Estadística de embriones de calidad B

El número de embriones de calidad C en el grupo que se transfirió en día +5 fue netamente superior al del resto de grupos: $2,50 \pm 0,61$ frente a 0,98 en +2 y 1,27 en + 3. Porcentualmente, fue el mayor número de embriones que se consiguió en el grupo +5, esto es, la mayoría de embriones en estadio de blastocisto fueron de calidad C (63,49%). (Tabla 25)

Estadísticamente, el que la media de embriones C en día +5 sea mayor también se refleja. La media es estadísticamente significativa con respecto a la transferencia en día + 2. Entre el día +3 y + 5 el análisis no arroja diferencias entre ambos grupos. (Tabla 31)

Comparación de medias	Día +2	Día +3	Día +5
+2	NA	0,25	0,013*
+3	0,25	NA	0,052
+5	0,013*	0,052	NA

Tabla 31.-Estadística de embriones de calidad C

Finalmente, el número de embriones de cuarta categoría es muy reducido. El mayor porcentaje corresponde al grupo + 2 (12,22%, media de $0,23 \pm 0,038$ embriones por ciclo). En día +3 sólo es un 5,19% de embriones y en día +5 se reduce aun más, un 3,17%. (Tabla 25)

Realizando la comparación de medias no aparecen diferencias entre grupos. (Tabla 32)

Comparación de medias	Día +2	Día +3	Día +5
+2	NA	0,334	0,213
+3	0,334	NA	0,450
+5	0,213	0,450	NA

Tabla 32.-Estadística de embriones de calidad D

En el estudio se reflejó que la media de los embriones totales es mayor en el grupo de transferencia en blastocisto ($3,94 \pm 0,256$) frente al resto (+2: 1,91; +3: 2,75). Sin embargo, el mayor número de embriones se obtuvo en ciclos con transferencia

en día +3. Es lo esperable, pues el número de ciclos fue el mayor de los 3 grupos. (Tabla 25)

Con el objetivo de corroborar los datos obtenidos, realizamos una comparación de medias, en las que se puso de manifiesto que en el grupo con transferencia en día +2, la media de embriones era menor que los grupos +3 y +5 ($p < 0,05$). Entre los grupos +3 y +5 no aparecieron diferencias estadísticamente significativas, aun habiendo diferencias entre las medias de embriones (+3:2,75 ; +5:3,94). (Tabla 33)

Comparación de medias	Día +2	Día +3	Día +5
+2	NA	0,022*	0,020*
+3	0,022*	NA	0,216
+5	0,022*	0,216	NA

Tabla 33.-Estadística de embriones totales

La tasa de fecundación por ciclo fue mayor en los ciclos en los que se planteó el cultivo largo. Concretamente, el 55,3% de los embriones fueron fecundados correctamente, una tasa mayor que el grupo + 3, 48,82% y en día +2, de 29,06%. Estos datos se correlacionan con el número de embriones y calidades de los mismos que hemos relacionado con anterioridad. (Tabla 34)

Tasas	Día +2	Día +3	Día +5
Tasa de fecundación	29,06%	48,82%	55,33%
Tasa de gestación	29,5%	40,03%	56,2%
Gestación A+B	44,4%	46,51%	50%
Tasa de aborto	6,4%	7,1%	0%
Tasa de cancelación	2,12%	7,14%	6,25%

Tabla 34.-Tasas de TESE

Para asegurar un criterio estadístico, utilizamos el estadístico de χ^2 , una prueba no paramétrica que nos validará la diferencia entre las diferentes tasas de fecundación obtenidas.

El resultado de esta prueba nos ofrece un nivel crítico de 0,020 entre los grupos de transferencia en día +2 con respecto a día + 3 y +5. Ya que este nivel crítico es inferior a 0,05, podremos decir que ambas variables son independientes, esto es,

por tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre las tasas. Sin embargo, entre el grupo + 3 y + 5 no aparece esa significación. (Tabla 35)

Tasa de fecundación- χ^2	Día +2	Día +3	Día +5
+2	NA	0,022*	0,020*
+3	0,022*	NA	0,216
+5	0,022*	0,216	NA

Tabla 35.-Estadística de tasa de fecundación

La tasa de gestación, finalmente, es el parámetro más importante en nuestro estudio. Podemos observar que para muestras procedentes de TESE que se ha realizado cultivo largo esta es de 56,2%, superior a día +3 (40,3%) y +2 (29,5%). (Tabla 34) Para reforzar nuestros resultados se realizó una comparación de proporciones, revelando una diferencia estadísticamente significativa entre la tasa de gestación en transferencias en día +2 y +3. Sin embargo, aun siendo una tasa mayor, no apareció un valor crítico inferior a 0,05 al comparar las tasas del grupo +3 y + 5. (Tabla 36)

Tasa de gestación- χ^2	Día +2	Día +3	Día +5
+2	NA	0,022*	0,020*
+3	0,022*	NA	0,216
+5	0,022*	0,216	NA

Tabla 36.-Estadístico de tasa de gestación

Por último al agrupar las mejores calidades embrionaria (A + B) , observamos que la tasa de gestación es mayor si se realiza el cultivo largo. Sin embargo, no aparece una significación estadística, probablemente debido a la baja n final en este estudio. (Tabla 37)

Tasa gestación A+B χ^2	Día +2	Día +3	Día +5
+2	NA	0,022*	0,020*
+3	0,022*	NA	0,216
+5	0,022*	0,216	NA

Tabla 37.-Estadístico de transferencia de A+

7.1.-TESE por alto grado de fragmentación.

Por último, en el caso de que el índice de fragmentación fuese superior al 40% y, tras la realización de una técnica de MACS sin resultado positivo, se planteó realizar una biopsia testicular el mismo día de la punción folicular.

En estos casos, se procesa la muestra una vez contamos con ovocitos válidos para realizar la ICSI.

Desgraciadamente, en el periodo que transcurrió el presente estudio el número de ciclos con este protocolo fue muy reducido. Sin embargo los resultados expuestos no hacen sino ofrecernos buenos resultados, que aun no siendo comparables estadísticamente, sí nos indicaron que el tratamiento propuesto puede dar lugar a una mejor tasa de gestación clínica en pacientes con un índice de fragmentación del ADN espermático gravemente alterado.

Al igual que ocurrió en pacientes sometidos a biopsia testicular sin indicación de fragmentación, se tuvo en cuenta la transferencia en día +2. En total, fueron 34 ciclos los realizados con este protocolo distribuidos de la siguiente forma:

Grupo de TESE	Transferencia en +2	Transferencia en +3	Transferencia en +5
Número de ciclos	13	18	3

Al igual que en el caso anterior, el número de ovocitos fue mucho mayor en ciclos con transferencia en día +3 y día +5 (+2: $8 \pm 3,97$; +3: $11,56 \pm 3,014$; +5: $13,33 \pm 3,01$), lo cual se vió reflejado en la media de ovocitos fecundados (+2: $2,00 \pm 1,20$; +3: $5,50 \pm 1,85$; +5: $5,67 \pm 2,88$).

La media de embriones totales a consecuencia de esto también fue menor cuando se realizó transferencia en día +2 con respecto a los otros dos grupos (+2: $1,67 \pm 0,77$; +3: $3,00 \pm 1,49$; +5: $3,00 \pm 1,00$), siendo su distribución porcentual muy similar en los tres grupos a estudio. (Tabla 38)

	Día +2	Día+3	Día+5
Ovocitos obtenidos	8,00±3,977	11,56±3,014	13,33±6,351
Ovocitos metafase II	6,21±4,112	9,66±3,143	9,87±3,212
Ovocitos fecundados	2,00±1,206	5,50±1,855	5,67±2,887
Embriones			
Calidad A	0,08±0,495	0,56±0,705	0,33±0,577
%	6,3%	13,63%	12,69%
Calidad B	0,33±0,492	0,72±0,669	1,33±0,577
%	26,66%	31,81%	22,22%
Calidad C	1,17±0,718	1,72±1,179	1,33±0,577
%	51,11%	46,10%	63,49%
Calidad D	0,08±0,289	NA	NA
%	12,22%	5,19%	3,17%
Embriones totales	1,67±0,778	3,00±1,495	3,00±1,00
%	27,10%	46,38%	18,97%

Tabla 38.-Estadísticos descriptivos de TESE por alta fragmentación

En cuanto a las tasas finales, teniendo en cuenta el reducido número de ciclos, se reflejaron unas tasas de gestación elevadas (+2: 38,46%, + 3: 38,88% y +5:66.66%). Las tasas de fecundación fueron las esperadas para este tipo de muestra seminal. (Tabla 39)

Tasas	Día +2	Día +3	Día +5
Tasa de fecundación	32,20%	56,93%	57,44%
Tasa de gestación	38,46%	38,88%	66,66%
Tasa de aborto	7,69%	5,55%	0%

Tabla 39.-Tasas de TESE por alta fragmentación

8.-Análisis Multivariante de la población a estudio

Una vez establecida nuestra población de estudio y tras el análisis de los datos que nos ofrecieron los ciclos realizados en nuestra clínica, se busco la forma en que las diferentes variables analizadas influyen en la consecución del embarazo.

Para ello, se codificaron todos los ciclos en cuanto a las siguientes variables:

- Consecución del embarazo.
- Edad de la paciente cuando se realizó el ciclo. Con tres categorías:
 - Pacientes menores de 35 años.
 - Pacientes entre 35 y 40 años.
 - Pacientes mayores de 40 años.
- Número de ovocitos obtenidos.
- Número de ovocitos correctamente fecundados.
- Número de embriones totales.
- Número de embriones de calidad A.
- Número de embriones de calidad B.
- Número de embriones de calidad C.
- Número de embriones de calidad D.
- Día de transferencia.
- Número de embriones transferidos de calidad A.
- Número de embriones transferidos de calidad B.
- Número de embriones transferidos.

Una vez obtenidos y clasificados todos los datos, nuestro objetivo fue obtener una estimación no sesgada y ajustada de la relación entre nuestra variable de resultado (embarazo o no embarazo) y los diferentes factores que puedan influir en la consecución del mismo.

Estos factores ya habían sido demostrados con anterioridad que influyeron en la consecución del embarazo, como se ha visto en los puntos anteriores de este estudio.

A continuación, evaluamos estos factores de forma simultánea para conocer su papel predictor y el efecto que ejercen sobre nuestra variable de estudio.

Para ello se realizó un análisis multivariante con el fin de averiguar las interacciones entre las variables y aislar posibles factores confundentes.

En un principio, en nuestro modelo introduciremos todas las variables previamente citadas, pues clásicamente todas se han relacionado con la posibilidad de conseguir el embarazo.

Primero se generó un modelo de regresión logística con las covariables y la variable a estudiar: consecución de embarazo. Dado que nuestro tamaño muestral (2262 ciclos) es suficientemente grande, podremos estudiar todas las covariables sin tener que seleccionar las que tuviesen un mayor impacto.

Observado			Pronosticado		
			Diagnostico gestación		Porcentaje correcto
			no embarazo	embarazo	no embarazo
Paso 1	Diagnostico gestación	no embarazo	787	275	74,1
		embarazo	478	375	64,0
	Porcentaje global				70,7

Tabla 40.-Tabla de clasificación

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Odd Ratio	I.C. 95,0% para EXP(B)	
		Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
Paso 1(a)	Calidad Seminal	-,208	,098	4,532	1	,033	,812	,670	,984
	Ovocitos obtenidos	-,045	,025	3,392	1	,066	,956	,911	1,003
	Embriones fecundados	-,009	,031	,088	1	,767	,991	,933	1,053
	Embriones calidad A	,131	,089	2,155	1	,142	1,140	,957	1,357
	Embriones calidad B	,097	,072	1,805	1	,179	1,102	,957	1,269
	Embriones calidad C	,133	,066	4,056	1	,044	1,142	1,004	1,299
	Embriones calidad D	-,063	,288	,048	1	,826	,939	,534	1,650
	Día de transferencia	-,718	,130	30,284	1	,000	,488	,378	,630
	Embriones totales	-,060	,059	1,053	1	,305	,942	,839	1,056
	Embriones transferencia calidad A	,502	,143	12,245	1	,000	1,652	1,247	2,187
	Embriones transferencia calidad B	,184	,115	2,530	1	,112	1,202	,958	1,507
	Embriones transferidos	,054	,123	,195	1	,659	1,056	,829	1,344
	Edad	-,406	,156	6,774	1	,009	,666	,491	,905
	Constante	,437	,353	1,532	1	,216	1,549		

Tabla 41.-Variables en la ecuación generada en el modelo

El modelo nos reflejó significación estadística en 6 covariables: calidad seminal, ovocitos obtenidos, embriones de calidad C, día de transferencia, embriones de calidad A en la transferencia y por último en la edad. (Tabla 41) Estas son las variables que influyen en la consecución del embarazo según el modelo generado.

Se pudo ver la fuerza de la asociación al fijarnos en los Odds Ratio, siendo especialmente fuerte en la calidad seminal, día de transferencia, embriones de calidad A y la edad de la paciente.

En cuanto al modelo de clasificación, se pudo observar que funcionó mucho mejor cuando no se producía el embarazo, pues en un 75% de los casos los clasificó en el grupo correcto.

Estadísticamente, para ver si el modelo se ajusta a la realidad, se realizó el test de Hosmer y Lemeshow. Si no aparece significación estadística, esto nos indicó que había una elevada coincidencia entre los datos que se obtuvieron y los que nos dio como esperado el modelo generado, como así ocurrió ($p = 0,220$).

Paso	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1	10,695	8	,220

		GESTACION_DIAGNOS TICO = no embarazo		GESTACION_DIAGNOS TICO = embarazo		Total
		Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Paso 1	1	138	141,680	54	50,320	192
	2	140	130,630	52	61,370	192
	3	118	122,668	74	69,332	192
	4	117	116,263	75	75,737	192
	5	103	109,904	89	82,096	192
	6	109	103,807	83	88,193	192
	7	108	96,670	84	95,330	192
	8	78	90,484	114	101,516	192
	9	81	82,537	111	109,463	192
	10	70	67,357	117	119,643	187

Tabla 42.-Tabla de contingencias para la prueba de Hosmer y Lemeshow

Por tanto, se generó el siguiente modelo de predicción:

$$\text{Logit}(p) = 0,437 - 0,208(\text{calidad seminal}) - 0,45(\text{ovos obtenidos}) + 1,33(\text{emb cal C}) - 0,718(\text{día de transfer}) + 0,502(\text{emb cal A transfer}) - 0,406(\text{edad})$$

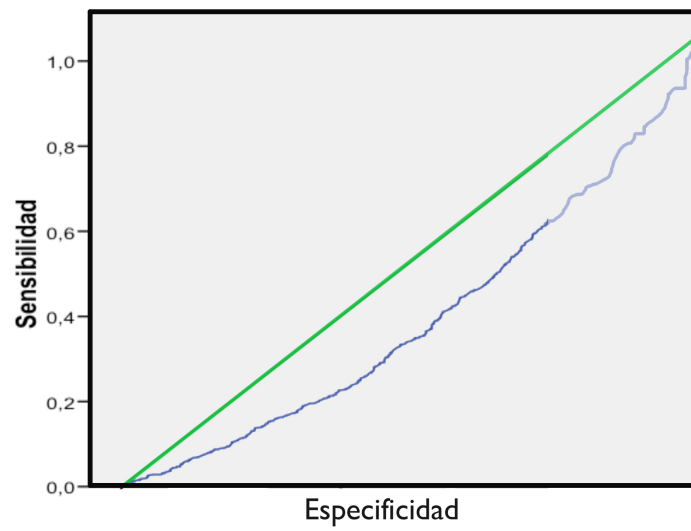
Siendo P la probabilidad de que un paciente tenga una gestación tras un ciclo de ICSI.

Para confirmar los datos obtenidos, se repitió la regresión logística, por el método por pasos hacia atrás de Wald, que nos brinda las mismas variables como influyentes. ($p < 0,05$) (Tabla 43)

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Odds Ratio	I.C. 95,0% para EXP(B)	
		Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
Paso 1(a)	Constante								
.		,471	,326	2,086	1	,149	1,602		
Paso (7a)									
	Calidad seminal	-,208	,098	4,549	1	,033	,812	,671	,983
	Ovocitos obtenidos	-,047	,021	4,690	1	,030	,955	,915	,996
	Embriones calidad C	,072	,037	3,867	1	,049	1,075	1,000	1,156
	Día de transferencia	-,685	,117	34,336	1	,000	,504	,401	,634
	Embriones transferencia calidad A	,602	,088	47,083	1	,000	1,825	1,537	2,168
	Embriones transferencia calidad B	,231	,085	7,410	1	,006	1,260	1,067	1,488
	edad	-,412	,156	7,010	1	,008	,662	,488	,898
	Constante	,473	,326	2,105	1	,147	1,605		

Tabla 43.-Regresión logística por pasos. Método de Wald

Por último, se generó la curva ROC del modelo, donde gráficamente se observa la curva ajustada al modelo pronóstico generado con los datos que se obtuvieron.



Grafica 18.-Curva Roc del modelo.

DISCUSIÓN

1.- Muestra seminal: "in vivo" vs "in vitro"

En el ser humano son millones de espermatozoides los que se depositan en el tracto femenino tras la eyaculación. Una vez allí los espermatozoides deben atravesar diferentes barreras que serán un primer filtro, ya que ofrecen un importante obstáculo para los espermatozoides "anormales". Una vez en el útero, los espermatozoides se ponen en contacto con el fluido uterino y con diferentes células, como los linfocitos polimorfonucleados. Además, la llegada de los espermatozoides van a modular la expresión génica local, preparando el oviducto de forma adecuada para la interacción entre los gametos y el desarrollo temprano del embrión.

El eyaculado se compone de subpoblaciones espermáticas, definidas por diferente motilidad, grado de fragmentación del ADN y morfología. Estas subpoblaciones van a tener mucha importancia en el caso de la reproducción de forma natural, y en el laboratorio de Reproducción Asistida deberán ser estudiadas en profundidad.

La movilidad es un parámetro muy importante, pues estudios como el de García-Vázquez [50] demostraron que tan solo a los 15 minutos de la deposición del semen, la mayoría de los espermatozoides con baja movilidad quedaban atrapados en la zona inferior del útero.

Los espermatozoides de los mamíferos tienen tendencia a interactuar con las células adyacentes y a nadar sobre las superficies epiteliales. Un reciente estudio de este fenómeno indicó que los espermatozoides de la especie humana nadan de forma bidimensional y manteniendo un contacto íntimo con el tracto reproductivo femenino, lo cual les permite progresar de forma mas rápida que los de otros mamíferos, como los toros.

Se cree que existe una selección morfológica de los espermatozoides en el tracto genital femenino que hace que solo un pequeño número de espermatozoides lleguen al oviducto. Solo los espermatozoides morfológicamente normales, sin capacitar y con el ADN intacto son capaces de interactuar con el epitelio del oviducto [51]. Sin embargo el número de espermatozoides con estas características

es mucho mayor en el eyaculado que los que alcanzan el reservorio. Por tanto, debe existir esa selección mas compleja en el tracto femenino.

Dado que el ambiente es hostil en el cérvix y en el útero, aquellos que no tienen una buena progresión son seleccionados negativamente. Garcia-Vázquez [50] describe que estos espermatozoides poseen tanto la cabeza como el flagelo mas pequeños. En el útero, el plasma seminal protege a los espermatozoides y les aporta ciertas proteínas de membrana que les permite realizar el recorrido hasta las trompas. Además, les proporciona sustratos para activar la fosforilacion oxidativa, estabilizando la membrana plasmática e impide la capacitación y la reacción acrosomica prematura [52].

La fosforilación oxidativa y la glucolisis van a proporcionar el ATP necesario que necesita el espermatozoide para la movilidad. Estas reacciones se dan en la parte intermedia del espermatozoide, con lo que formas defectivas van a ser seleccionadas negativamente.

Se han postulado teorías, como la de Gormendio y Roldan [53][54], que valiéndose de la hidrodinámica, postulan que espermatozoides con cabezas alargadas tendrían una mejor progresividad. Sin embargo, Mossman [55] estudiando la media del tamaño flagelar y la longitud de los espermatozoides, no obtuvo una relación entre estos dos valores y la velocidad de los espermatozoides.

Otros estudios en humanos han relacionado tamaños de la cabeza de los espermatozoides grandes con mayores tasas de fertilidad que en pacientes infértiles [56].

La relación entre la morfología espermática y la fertilidad ha estado en discusión durante los últimos 90 años. [19]. Sin embargo los resultados que han ido obteniendo los diferentes grupos de estudio no han sido concluyentes, pues son muchos los factores que influyen en la relación morfología espermática- fertilidad: diferentes especies, edad, madurez sexual, etc. Además, han sido muchos los protocolos utilizados, tanto a nivel de laboratorio, como de protocolo de estudio, relaciones estadísticas, etc.

El estudio de los espermatozoides es cada vez mayor, y se ha incrementado en las ultimas décadas con el desarrollo de los tratamientos de Reproducción Asistida. No solo se tienen en cuenta la motilidad, sino otras pruebas como la viabilidad (integridad del plasmalema, o test hiperosmotico), la integridad acrosomal o la ausencia de anomalías morfológicas son factores que se han estudiado para predecir la fertilidad, o al menos, identificar aquellas muestras con bajo potencial. Otros estudios como sondas de fluorescencia, citometría de flujo que nos pueden indicar el estadio de la fragmentación del ADN o el grado de madurez de la cromatina nos pueden indicar mas datos sobre muestras seminales.

Las particularidades de este tipo de célula la hacen única en el ser humano: desarrolla parte de su "vida" dentro del cuerpo y la otra parte en un ambiente hostil y transfiere la carga genética del varón al ovocito. Por otra parte, son células muy especializadas y con grandes variaciones en la naturaleza.

Esta diversidad de formas se cree que es debida a la adaptación a las condiciones a las que la célula se ve sometida para maximizar su capacidad de fertilidad. Se han descrito espermatozoos de multitud de especies, observándose claras diferencias entre ellas [57]. Además la competitividad entre los espermatozoides se ha demostrado como una fuente muy significativa de la variabilidad. [53] [58].

La variación morfológica ha sido, por tanto, guiada por la evolución. Desde el desarrollo de las técnicas de Reproducción Asistida se ha introducido un nuevo factor de variación, pues la selección espermática ha pasado a sufrir un filtro mas a manos del biólogo y de las técnicas desarrolladas en laboratorio. Estas técnicas tienen el objetivo de maximizar la probabilidad de conseguir un niño en casa en el mínimo tiempo posible.

Aun así, los pacientes con un número de espermatozoides optimo deberían tener mejores tasas de éxito, pues tras el procesamiento de la muestra se podría hacer una mejor selección espermática a la hora de realizar un TRA. Sin embargo, hay estudios como el de Esteso, en 2006, que identificó que formas espermáticas con un tamaño de cabeza mas pequeño soportaban mejor la criopreservación que las formas clasificadas como normales [59].

Igualmente, la forma de preparar la muestra seminal ha influido a la hora de conseguir el éxito en un ciclo de reproducción asistida.

Los espermatozoides al migrar activamente a través del tracto genital femenino y atravesar el moco cervical sufren una serie de modificaciones que en el laboratorio se tratan de imitar. Mediante diferentes protocolos de selección espermática, el objetivo final es obtener una suspensión rica en espermatozoides con buena morfología y buena motilidad.

La cuestión es que en el proceso fisiológico no solo se seleccionan las formas morfológicamente correctas y con movilidad progresiva, sino que las células sufren cambios, la llamada capacitación, que es el prerrequisito fundamental para la adquisición de la competencia funcional para realizar la reacción acrosómica y fertilizar el ovocito [60]. Sin embargo, estos procesos no son bien conocidos y cómo afectan a la morfología de la célula que producirá la fecundación.

García-herrero, en 2015, describió cambios en la morfología espermática en gametos bovinos tras la capacitación "in vitro".

Durante la migración de los espermatozoides a través del tracto genital femenino hacia la zona de la fertilización la motilidad es esencial [61]. Sin embargo, aunque existen muchos estudios que relacionan la buena movilidad espermática con la buena morfología [62][63][64][65][66], existen otros en los que ambos parámetros no tienen porque estar relacionados. Es por tanto, un punto clave en la selección espermática en el laboratorio el discriminar la movilidad espermática de la morfología de los gametos a estudio.

Gormendio[53], en su estudio sobre la diversidad de las formas espermáticas y su correlación con la capacidad de producir la fecundación concluyó que la una forma espermática adecuada no se relacionaba con la movilidad de dicho espermatozoide. Malo, en su estudio de formas espermáticas en diversos mamíferos, en 2005 llegó a la misma conclusión[64]. Otros estudios en muestras seminales humanas, como el de Humpries en 2008 [67], se centraron en la competitividad entre los espermatozoides de un mismo eyaculado, y resultaron en que la motilidad no tenía por qué estar relacionada con los espermatozoides capacitados.

Por tanto, la morfología espermática es un parámetro que sigue estando en discusión entre los diversos grupos de estudio. Se ha establecido la necesidad de una valoración mínima de la morfología espermática de al menos 200 espermatozoides por muestra como representativa de la misma [68], parámetro que en nuestro estudio se estableció como conteo mínimo. Otros autores como Maree o Gravance [69][70] han estimado que el número de formas valoradas puede ser menor. Sin embargo, al realizar un estudio estadístico se observa que las formas anormales se distribuyen en los extremos de la distribución, con lo que los intervalos de confianza pueden variar [71]. Por tanto, el coeficiente de variación se incrementa de forma considerable al estudiar un número de muestras bajo, lo que impone el conteo de un número celular alto para dar un resultado confiable y minimizar la variación subjetiva del investigador.

La preparación de las muestras seminales para un TRA es también un factor clave y de debate entre los diferentes grupos: ¿Los espermatozoides deben sufrir un proceso similar al que se ven sometidos "In vivo"? Tanto si se va a realizar una FIV convencional, como si se va a realizar una ICSI, los espermatozoides deben ser capacitados: ser capaces de unirse a la zona pelúcida, realizar la reacción acrosómica, penetrar la ZP, fusionarse con el oolema y producirse la fecundación. En el caso de la ICSI muchos de estos pasos van a ser superados, pero los espermatozoides deben estar en su momento óptimo y haber pasado la selección adecuada para obtener el mayor éxito posible.

Durante los últimos años han sido varias las técnicas utilizadas en el laboratorio de andrología con el fin de imitar la capacitación fisiológica y la activación espermática. Básicamente han sido tres las técnicas utilizadas: el lavado seminal, la separación espermática por gradientes de densidad y la utilización del "swim up".

No solo necesitamos poder filtrar los espermatozoides con mejor movilidad y morfología, sino que junto a ellos en el eyaculado, se encuentran espermatozoides muertos y células linfoides, que generan especies reactivas del Oxígeno, que pueden afectar a la carga genética del espermatozoide, concretamente fragmentando su ADN [72].

En el presente estudio no se realizó el lavado seminal con medio de cultivo, pues ya se ha demostrado que no separa de forma efectiva los espermatozoides con morfología alterada frente al resto y tampoco nos permite separar el resto de componentes del eyaculado de forma efectiva.

En cuanto a la técnica de "Swim-up", donde se aprovecha la movilidad de los espermatozoides, se ha observado que junto a ellos pueden difundir otras sustancias como iones de Zinc que pueden afectar a la estructura y función espermática [73].

Los gradientes de densidad se basan en que con la maduración espermática, la densidad de los espermatozoides aumenta al compactarse la carga genética, al cambiarse las histonas por protaminas [74]. Por el contrario, los espermatozoides apoptóticos, aquellos con alteraciones en la membrana y los que están en estado de senescencia tienen una densidad menor. Dado que aquellos con buena morfología se calcula que tienen una densidad de $1,17 \text{ g/cm}^3$, utilizando gradientes discontinuos que se ajusten a la misma se puede realizar una separación efectiva [75].

Sin embargo grupos de estudio como el de Bartoov y el de Monqaut [76] han indicado que solo con la selección espermática por gradientes o con la técnica de "swim-up" no se consigue eliminar efectivamente la mayoría de los espermatozoides con alteraciones morfológicas. Por tanto la utilización de ambos métodos puede ayudarnos a seleccionar los espermatozoides con mejor morfología espermática junto con la separación de las células que los acompañan. Ng en 1992 empezó a usar ambos métodos, pero no describió que las morfologías mas alteradas eran descartadas. Yamanaka en 2016 comparo las diferentes técnicas de enriquecimiento espermático, observando que la conjunción de gradientes de densidad junto a "swim-up" separaban de forma efectiva los espermatozoides con buena morfología, incluso a nivel ultraestructural. Además, utilizando ambas técnicas, se eliminaban la mayoría de los espermatozoides con fragmentación alterada [77].

Se vió que las alteraciones de cabeza disminuían al someter la muestra seminal al gradiente de densidad, con lo que espermatozoides con alteraciones de membrana, alteraciones en la condensación de la cromatina y aquellos que no se encuentren en la fase madurativa correcta son descartados. Con el "swim-up" disminuyen los espermatozoides con alteraciones en la cola [77] y que estén en estados de apoptosis o necrosis [78].

Xue y Yamanata indican que con la técnica de "swim-up" se disminuye drásticamente el índice de fragmentación, y este último grupo de estudio concluyó que con ambas técnicas en conjunción se obtenían los mejores resultados. [77][78] Otros estudios [79] ya habían indicado que con los gradientes de densidad se disminuía de forma muy efectiva el índice de fragmentación .

En el presente estudio y en el laboratorio de Andrología de Ginefiv se protocolarizó el uso de ambas técnicas en conjunto, con lo que se obtienen una suspensión espermática no solo con una alta movilidad y con la mejor morfología posible, sino que la mejor integridad y madurez del ADN es seleccionada.

Aun así, será el proceso de la ICSI cuando, en el microscopio, se realizará la selección definitiva del espermatozoide con mejor morfología, dentro del rango morfológico de cada muestra seminal.

2.-Datos generales de la pacientes sometidos a TRA

Desde el desarrollo de la técnica de ICSI por Palermo en 1992 y con la consecución de embarazos con muestras seminales alteradas se han ido obteniendo datos por diferentes grupos cuyos resultados nos permiten ofrecer a los pacientes una aproximación a lo que se podría esperar de ciclos similares al suyo, así como ayudar a otros grupos de investigación a mejorar sus resultados.

La tasa de fecundación de los ciclos realizados en el presente estudio nos dió un resultado del 79,22% en conjunción de transferencias en día +3 y día +5. Ya en 1993 Van Steirteghem realizó un estudio sobre 1409 ovocitos revelando una tasa de fecundación del 64,2% [80]. Otros estudios más recientes son más acordes con el valor obtenido por nosotros: 72,9%[81] ,91,2%[82], o dependiendo de subgrupos de calidad seminal desde el 75,38% a 82,19% [83].

La tasa de gestación clínica es el parámetro más importante a valorar en un tratamiento de reproducción asistida. En el apartado general, se obtuvo una tasa del 39,74%, siendo acorde con la tasa general de nuestro centro, y superior a la publicada por la Sociedad Española de Fertilidad (2015)[84], que es del 37,3%. Otros estudios como el de Chapuis (2016)[85] ofrecen una tasa de 33,42%, o el de Luz de 37,85% (2016)[86].

Como era de esperar, la transferencia de embriones de buena calidad, agrupando los categorizados como calidad A y calidad B, obtuvieron una tasa de gestación clínica superior a la tasa general (44,26%). En el 67,7% de los ciclos realizados se consiguieron embriones clasificados en estas categorías.

Esto concuerda con la selección morfológica embrionaria propuesta por la SEF y ASEBIR, así como los grandes grupos de investigación. Rackwsky[87], Van Loenersloot[88] y Devreker[89] que inciden en la selección embrionaria, pero otros grupos han centrado su investigación no tanto en la clasificación como en la cantidad de embriones disponibles para la transferencia [90][91].

3.-Transferencia en día + 3

El cultivo embrionario con transferencia en día +3 se han protocolarizado en los laboratorios de TRA en los últimos años.

Dado que nuestro objetivo fue poner de manifiesto la influencia de la morfología espermática altamente patológica en el desarrollo embrionario temprano, se observó el resultado de los ciclos de pacientes con la morfología muy alterada y ciclos con muestras normales.

Se obtuvieron una media de ovocitos similar en ambos grupos, con lo que pudimos decir que, a priori, los ovocitos no iban a ejercer una influencia sobre el resultado.

En la última década, la hiperestimulación controlada ha dado como resultado la mejora y optimización de los ciclos de estimulación ovárica. El objetivo ha sido obtener un número óptimo de ovocitos, pero también teniendo en cuenta su morfología y calidad, y a su vez, deben estar en el estadio adecuado de metafase II.[92][93][94]

Aun así, el número correcto de ovocitos es difícil de discernir, pues hay que tener en cuenta que un número bajo va a limitar la selección embrionaria, y un número alto puede influir no solo en la calidad de los ovocitos obtenidos sino también en la posibilidad de que se produzca un síndrome de hiperestimulación en la paciente.

El "Intervalo óptimo" según diversos autores es la obtención de entre 5 y 15 ovocitos [95][96], aunque la ESHRE en 2011 propuso como 15 el número óptimo. Sin embargo, tampoco debemos fijarnos únicamente en el número obtenido, sino en los ovocitos en el estadio madurativo adecuado. El intervalo considerado óptimo en nuestro centro estaría entre 6 y 10 ovocitos en estadio de metafase II.

En el presente estudio obtuvimos una media similar de ovocitos en metafase II en ambos grupos, con lo que la comparación sigue siendo válida. El número de ovocitos en metafase II es un parámetro indicador de la consecución de la gestación.[97][98][96]

En cuanto a la media de ovocitos fecundados fue similar ($8,11 \pm 1,56$ y $8,32 \pm 3,72$), pero al observar las tasas de fecundación, si que observamos que fue mayor en las muestras con morfología normal. Aun así, la tasa de fecundación, del 74,9% y del

83,5% están dentro de la normalidad , y son superiores a las reflejadas por la SEF (66,6%). La disminución de la tasa de fecundación en embriones generados a partir de muestras seminales patológicas es algo esperable y que coincide con varios grupos de investigación. Chapuis en el 2015 estudio ciclos de IVF con diversos grupos de calidad seminal y observo que pacientes con baja movilidad espermática y morfología daban lugar a tasas de fecundación reducidas comparadas con muestras clasificadas como normales [85]. Borges[99] encontró el mismo resultado, aunque lo asocio a que morfologías espermáticas alteradas pueden ir asociadas a bajas concentraciones y motilidad espermática. Un número bajo de espermatozoides en eyaculado ya fue descrito por Kruger [100] como factor predictivo para resultados de IVF. Zhu en 2012 justifico el uso de ICSI frente a FIV convencional en pacientes con graves alteraciones morfológicas pues obtuvo mejores tasas de fecundación al realizar la Microinyección [101]. Aun así, otros grupos como el de Lockdown discuten que la morfología sea un factor pronóstico. [102]

En cuanto a la media de embriones generados($3,79 \pm 2,63$ y $3,66 \pm 1,85$) y a su clasificación por categorías y morfológica, se obtuvieron resultados muy similares en ambos grupos. Esto es un resultado esperado, pues la selección espermática al realizar la ICSI va a dar lugar a la microinyección de los mejores espermatozoides disponibles del paciente. Dado que el número de ovocitos fue similar en ambos grupos, y dado que las primeras divisiones se ha postulado que dependen de la carga genética del ovocito, es de esperar que el desarrollo embrionario durante los 3 primeros días no sea dependiente de la calidad de los espermatozoides, al menos a un nivel puramente numérico, como se ve reflejado en nuestros datos.

Aunque algunos grupos lo describieron como factor pronóstico, el “patrón nucleolar” en el cigoto no va a determinar la evolución del embrión, pues es independiente del desarrollo embrionario [103]. Al observar el desarrollo de los embriones es cuando vamos a poder dar una predictibilidad del potencial implantatorio de dichos embriones. Aquellos que se dividen mas lentamente o bien mas rápido, tienen una tasa de embarazo menor que aquellos que se dividen según

el ciclo celular y de forma sincrónica. (día +2: 4 células, día +3, 8 células). Además, los que se dividen con un ritmo mas rápido o lento tienen una mayor incidencia en anomalías cromosómicas. [104] Este dato se ha visto en una tesis realizada en nuestro mismo grupo de investigación [105].

La división celular desigual también se ha relacionado con la disminución de las tasas de implantación y de gestación. Alteraciones como las aneuploidias son mayores en embriones con blastómeros desiguales [106].

La presencia de fragmentación también va a comprometer su viabilidad. Se ha indicado que la presencia de grandes fragmentos en día +2 y día +3 pueden dejar al embrión sin vacuolas o vesículas pinocíticas lo que va a comprometer su viabilidad. Se ha indicado que esto puede ocurrir cuando la fragmentación se genera en la primera y segunda duplicación celular. Incluso se ha relacionado las altas tasas de fragmentación con la presencia de mosaicismos [107].

Por tanto, es de vital importancia realizar una buena clasificación embrionaria con el fin de optimizar las tasas de implantación y de gestación.

Las primeras divisiones del embrión dependen del ovocito y de sus estructuras, pues el espermatozoide no va a aportar nada mas que la carga genética haploide procedente del varón [108]. El desarrollo embrionario en estas primeras divisiones se ha clasificado como de “silencio transcripcional”, pues es en estos 3 primeros días del desarrollo cuando se realiza el paso de ovocito a embrión.

En este tiempo se produce la fusión del núcleo espermático con el ovocitario, la formación y fusión de los pronúcleos y la reprogramación genética y epigenética que va a finalizar con una masiva activación del genoma del propio embrión durante el estadio de entre 4 y 8 células en adelante. Esta activación empezará, pues, a ocurrir durante el mismo día + 3.

Ya en 1988 Tesarik[46], y Braude en 1989[109], indicaron este periodo de tiempo como crítico para la activación del genoma embrionario. Taylor en 1997 detectó los primeros transcritos procedentes del genoma paterno en el estadio de 4 células,

aunque Braude había señalado que ocurrían en el paso del estadio de las 4 a las 8 células. Coben en 1998 volvió a señalar que durante este primer periodo del desarrollo la transcripción del genoma embrionario es mínima. Dobson (2008) posteriormente observó que es en el día +3 del desarrollo cuando se detecta un gran aumento de la producción de los mRNAs. Los mRNAs generados antes de este día representan una mínima actividad transcripcional, siendo además la mayoría procedentes de la carga genética del ovocito.

Por tanto, es el ovocito el que durante los primeros compases de la división embrionaria el que va a ser clave en la consecución de embriones viables [111]. El éxito en la correcta compactación del pronúcleo masculino y la fertilización del gameto femenino va a deberse en gran parte a la calidad ovocitaria. El ovocito debe reactivar la división a partir del estadio de metafase II, finalizar la correcta maduración del citoplasma activando los gránulos corticales aumentando los niveles de calcio, sufrir cambios mitocondriales, activar la síntesis de proteínas y por fin, volver a activar el citoesqueleto, fundamental para la correcta división celular que se llevara a cabo a continuación [112]. Por tanto, cualquier defecto en estos procesos van a dar lugar su incorrecta activación.

Con la entrada del espermatozoide, procesos que afectan a la carga genética del mismo como la descondensación, la activación de las protaminas, posibles reparaciones del ADN, activación de los orgánulos y la formación de la envuelta nuclear van a estar dirigidas y promovidas por proteínas que se encuentran en el ovocito [113].

Son pues, los resultados obtenidos los que se esperan tras la correcta fecundación embrionaria: un desarrollo similar en ambos grupos. Será a partir del día +3 cuando el embrión empiece a expresar su propio genoma, y en donde se debería apreciar diferencias entre ambos grupos. Ya que fue en este momento cuando se realizó la transferencia embrionaria, es la tasa de gestación donde se deberían ver reflejadas las patologías espermáticas.

Se observó que con una media similar de embriones transferidos por ciclo (1,74 y 1,70), la tasa de gestación era notablemente mayor en pacientes sin patología seminal. Los últimos datos de la SEF (2015) indican que la media en España es de 1,8 embriones transferidos por ciclo, datos similares a los nuestros.

De hecho, se consiguieron un mayor porcentaje de embriones clasificados como de mejor calidad en pacientes con patología seminal, lo que no se reflejó en la tasa de gestación (Morfología alterada: A: 21,10%; B: 37,20%; Morfología normal: A: 20,49%, B:35,70%). Esto nos indica que en estos primeros días de desarrollo, la morfología embrionaria no es capaz de predecir con exactitud el potencial de implantación: el genoma del embrión todavía no se ha empezado a expresar.

Se ha sugerido que defectos en la cabeza del espermatozoide, con aparición de vacuolas pueden influir en el desarrollo temprano del embrión [114] además de una disminución en el potencial de la fecundación (76) y producen una disminución en la implantación [114].

Zheng en el año 2016 también informo de que muestras seminales alteradas o de muy baja calidad tenían como resultado menores tasas de gestación tras la realización de una ICSI [115].

Por tanto, una diferencia de un 6,6% en la tasa de gestación a favor del grupo con muestras seminales normales (35,76% frente a 42,36%), ve refrendada nuestra hipótesis de que la muestra seminal se va a ver reflejada mas adelante en el desarrollo embrionario. Con un número similar de embriones conseguidos en cultivo, e incluso transfiriendo embriones clasificados como de mejor categoría en muestras con patología seminal, es la tasa de gestación la que nos refleja la viabilidad de esos embriones.

No se pretende por parte de este trabajo ir en contra de la clasificación embrionaria propuesta por diversos grupos de estudio, al contrario, pues es cuando se transfirieron embriones clasificados como categoría A y B cuando la tasa de gestación es mayor con respecto al grupo de embriones totales.

La tasa de gestación con transferencia en día +3 fue, en España, de 38,5% según los datos de la SEF, con lo que nuestro centro se encuentra dentro del rango

esperado. Otros grupos, como el de Sotirowska[116] plantean un 38% de tasa de gestación en pacientes mayores de 36 años mientras que otros centrándose en la calidad seminal ha reportado tasas de gestación de 35,30% en muestras con graves patologías espermáticas [85]. La tasa de implantación, de 30,07% en pacientes con alteraciones fue estadísticamente menor que la de pacientes con morfología normal, de 33,81%.

La gestación evolutiva (32,5% frente a 37,35%) de 4,85% puntos superior en pacientes sin patologías no hace sino confirmar que embriones con un desarrollo embrionario temprano correcto pueden no genera embarazo. La cuestión es si estos embriones hubiesen cumplido los criterios de viabilidad en el desarrollo embrionario de haberlo realizado en las condiciones controladas del laboratorio.

4.-Transferencia en día +5

Con el desarrollo de mejores condiciones en el cultivo embrionario, se está consiguiendo una alta tasa de llegada a estadio de blastocisto. Clásicamente, la transferencia embrionaria se realizaba en día +2 o día +3, pero dependiendo de las indicaciones y patologías de los pacientes, la transferencia en día +5 se esta implantando en los laboratorios de Reproducción asistida.

No solo por el mayor seguimiento del desarrollo del embrión, sino porque se consigue una mayor sincronización con el endometrio, y por tanto una mayor similitud con los hechos que ocurren de forma natural.

Por un lado la estimulación ovárica mejora nuestro objetivo de obtener un buen número de ovocitos con los que poder trabajar, pero por otro esto va a tener un efecto adverso: ya que si bien el endometrio esta preparado para la transferencia en día +3, es en el día +5 de ciclo cuando los efectos de la medicación suministrada a la paciente van a ser menores, y es por tanto, el ambiente mas similar al que se da en la naturaleza [117], en la que el embrión accede al útero en día +5. El embrión a medida que se va desarrollando, va a avanzar mas allá de las 8 células en las que se transfiere en día +3 del desarrollo.

La duplicación celular seguirá adelante, y avanzará compactándose y formando una mórula, siendo un periodo crítico en el desarrollo pues va a ser cuando empiecen a formarse las tres láminas del embrión. Esto empieza a ocurrir una vez se ha dado la compactación, y las células se van a ir polarizando: las que migran a la zona externa del embrión darán lugar al trofoectodermo, mientras que aquellas que quedan en el centro del embrión son las que darán lugar a la masa celular interna. La masa celular interna es la que dará lugar al desarrollo de individuo “per se” mientras que fundamentalmente el trofoectodermo dará lugar a la placenta[118].

Con el uso de incubadores con tecnología “time-lapse” en los cuales se puede observar el desarrollo en directo, sin interferir en las condiciones de incubación, se ha observado que el desarrollo embrionario humano puede seguir aunque alguna de sus blastómeros sufra una lisis o bien que aparezca fragmentación en estas primeras duplicaciones celulares. Se han desarrollado varios algoritmos basados en los tiempos en los que se produce la duplicación celular, y con ellos se ha intentado predecir si un embrión llegara al estadio de blastocisto según el tiempo de duplicación celular. Así, Wong en 2010 propuso que si un embrión realizaba la primera división celular a las 14 horas \pm 6 minutos y posteriormente la división de 3 a 4 células ocurre 1 hora \pm 1,6 horas después, es un buen factor pronostico de que ese embrión llegue al desarrollo optimo en día +5 del ciclo [119].

Se ha dicho que el desarrollo correcto embrionario se debe mas a que las células se dupliquen en su tiempo ideal que debido a que el número sea el idóneo [120].

El objetivo principal de nuestro estudio es poner de manifiesto como la morfología de los espermatozoides influyen en el desarrollo embrionario, y diversos estudios indican que es a partir del día +3 de desarrollo cuando el genoma del embrión se activa [121].

No solo es la carga genética del embrión la que va a influir en el correcto desarrollo hasta blastocisto, hay una serie de factores intrínsecamente derivados de los espermatozoides implicados: el centrosoma que va a ir organizando las sucesivas divisiones es heredado por línea paterna [120]. Estudios sobre la

fragmentación del ADN espermático y la correcta maduración, en las que se sustituyen histonas por protaminas que pueden dar lugar a cortes en el ADN espermático [122], se van a poner de manifiesto en el desarrollo del embrión.

Un huso meiótico alterado puede dar lugar a segregaciones incorrectas en las sucesivas divisiones celulares, incrementando el número de aneuploidias y por tanto, afectando a la viabilidad del embrión [123].

Por tanto, el que un embrión se desarrolle de forma favorable hasta el día +5 nos indica que, primero, su genoma se ha activado [124] y segundo, nos va a mejorar las posibilidades de transferir un embrión viable [125].

En el presente estudio se generaron pues, al igual que en transferencias en día +3 de ciclo, dos poblaciones de pacientes: una con graves alteraciones en la morfología de los espermatozoides y otra clasificada como normal según los criterios de la OMS.

En cuanto al número de ovocitos, se obtuvieron una media similar en ambos grupos, con lo que pudimos descartar una influencia debida a los mismos. No hubo diferencias significativas estadísticamente, con lo que partimos de una población homogénea.

Cabe destacar que la media de los ovocitos es superior en este grupo de transferencias en día +5 que en el grupo de transferencia en día +3, así como la media de la SEF (8,7 ovocitos por ciclo) siendo nuestros valores de $12,92 \pm 5,59$ y $12,99 \pm 5,53$ en ambos grupos, ya a que un criterio de inclusión en la indicación de la realización de cultivo largo fue tener al menos 5 embriones de buena calidad en día +3, aunque bien es cierto que muchos pacientes desearon realizar este tipo de cultivo con un número de embriones menor. Volvemos a referirnos a los diferentes grupos de estudio que indican que un buen resultado es la obtención de entre 5 y 15 ovocitos, siendo de entre 5 y 10 en Ginefiv.

La media de ovocitos en estadio de metafase II fue similar en ambos grupos, si bien el número de ovocitos correctamente fecundados fue ligeramente superior en el grupo de muestras morfológicamente normales.

Como consecuencia de esto, la tasa de fecundación fue mayor en embriones generados por muestras normales, al igual que ocurría en el grupo de transferencia en día +3. Ambos resultados, de 75,91% y 82,6%, son superiores a los indicados por la SEF (66,7%).

Pero es en el número de embriones obtenido por ciclo donde vemos la gran diferencia entre ambos grupos: el número es menor en el grupo procedente de morfologías alteradas. Es decir, hay un mayor número de embriones que no llegan a estadio de blastocisto si proceden de muestras seminales con la morfología gravemente alterada: concretamente una media de 3,21 embriones frente a 4,66 en el grupo de muestras seminales con morfología normal.

Esto lo podemos explicar con lo argumentado anteriormente: son muchos los factores del desarrollo embrionario inherentes al espermatozoide, y es a partir del día +3 hasta la consecución del estadio de blastocisto cuando se van a expresar.

En ambos grupos el número de embriones por transferencia es similar, y muy cercano a 1 (Morfología alterada: 1,04; Morfología normal: 1,00), pues como veremos, la tasa de implantación y gestación son muy elevadas, y la transferencia de 2 o mas embriones no haría sino aumentar la tasa de embarazo múltiple.

Por otra parte, si nos centramos en las tasas, tanto la de gestación como la de gestación clínica son muy similares. Sotirovska en 2016 [116] ofrece una tasa de gestación del 57% en pacientes menores de 36 años, y del 48% en mayores de esa edad, siendo tasas similares a las obtenidas en este estudio: 52,72% en el primer grupo y 52,24% en el segundo. Otros grupos describen tasas similares, 60% en menores de 35 años y 55,6% en mayores [81]. Sin embargo, estos datos no diferencian entre calidades seminales, centrándose únicamente en el desarrollo embrionario.

En nuestro caso, una tasa de gestación evolutiva del 44,4% en muestras patológicas y del 46,71% en muestras de morfología normal, nos refleja que la muestra seminal no afecta a la hora de implantarse el embrión que hemos seleccionado y que ha llegado a estadio de blastocisto.

La tasa de implantación de 38,04% en muestras alteradas y de 37,51% en muestras normal fue similar, y muy superiores a las de transferencia en día +3.

Por otra parte la selección por morfología nos indico que los ciclos con transferencia de embriones de buena calidad(A+B) tuvieron como resultado tasas de gestación aun mayores (48,90% y 48,14%), por lo que el factor llegada a estadio de blastocisto no solo es de suma importancia, sino que la clasificación también nos permite discriminar que embrión tiene mas probabilidades de implantarse.

Aun así, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en este caso.

El porcentaje de ciclos cancelados por la no consecución de embriones viables en día +5 fue bajo (morfología patológica: 2,61% morfología normal:3,08%), similares a estudios como el de Yin [126] del 4%, o Chen [127] del 5,2%.

Por último, cabe señalar el alto porcentaje de ciclos en los que no se realizó transferencia por alteración en el endometrio, mucho mayor que en transferencias en día +3, esto es debido al número de ovocitos obtenidos por ciclo, superior a grupo de transferencias en día +3 (dia+3: 8,21 ; día +5: 12,95).

5.-Transferencia en día +3 frente a transferencia en día +5

Con el fin de poner de manifiesto las diferencias en el desarrollo embrionario en base a las alteraciones morfológicas de los espermatozoides se realizó la comparación de los datos obtenidos en base al día de la transferencia.

Ya que tanto la media de ovocitos obtenidos, fecundados y número de embriones por ciclo fue superior en los tratamientos con transferencia en estadio de blastocisto, se seleccionaron los casos de tratamiento con un número óptimo de ovocitos, que fue de entre 5 y 10 ovocitos en estadio de metafase II..

Con este intervalo óptimo, que esta dentro de las recomendaciones de la ESHRE, pudimos excluir el sesgo ajeno a la calidad espermática: un número bajo de ovocitos puede ser debido a una respuesta limitada a la medicación, mientras que un número alto puede dar como lugar a ovocitos de peor calidad [128].

Esta comparación se pudo realizar debido a los avances en el cultivo embrionario que se han realizado en los últimos años. El establecimiento de unas condiciones de cultivo optimas para el desarrollo embrionario ha sido posible con la mejora de los medios de cultivo y la implantación de nuevos tipos de incubadores adaptados a las TRA [129].

La mejora en los medios de cultivo, tanto secuenciales como único ha posibilitado una mayor llegada al estadio de blastocisto en el laboratorio [129]. Aunque por otro lado, a medida que el embrión va desarrollándose en el laboratorio, se van acumulando factores de crecimiento endógenos en las microgotas del cultivo, con lo que el cambio a medio nuevo en día +3 ha supuesto grandes mejoras en la tasa de llegada a estadio de blastocisto. Igualmente, otros compuestos volátiles procedentes de las placas de plástico utilizadas, del aire del laboratorio o del aceite que cubre a las microgotas pueden influir en el desarrollo embrionario.

El desarrollo de nuevos incubadores con filtros HEPA, control de CO₂, O₂ y N₂ han minimizado la entrada de estos compuestos volátiles, y con la investigación de las necesidades embrionarias en cuanto a la atmósfera de incubación han hecho posible que el cultivo largo sea una opción en el laboratorio de TRA gracias a la

cual podemos observar el desarrollo embrionario [130]. La acumulación de especies reactivas de O_2 en el citoplasma es probablemente el mecanismo que influye en la viabilidad del embrión en cultivo [131]. Además, la composición de la atmósfera en el incubador es un factor clave en el mantenimiento del pH en el medio de cultivo [132]. Por otra parte, el desarrollo de incubadores de tipo “bench-top” con un volumen mucho menor que los incubadores clásicos han permitido un mejor control tanto de temperatura como de concentración de gases, así como una recuperación mejor de las condiciones ideales de incubación cada vez que se abre la puerta para la observación del desarrollo embrionario [130].

El desarrollo de los medios de cultivo así como de los incubadores nos ha ofrecido la posibilidad de aumentar el tiempo de desarrollo embrionario en el laboratorio y observar su evolución con la consiguiente mejora en la selección embrionaria. Por tanto se puede poner de manifiesto el factor que juegan los espermatozoides en el desarrollo temprano del embrión. Nuestro fin será, en condiciones similares en cuanto al gameto femenino, observar las diferencias en el desarrollo embrionario cuando existe una patología espermática a nivel de la morfología.

5.1.- Desarrollo embrionario de pacientes con morfología alterada

En cuanto a los pacientes con la morfología gravemente alterada, pudimos ver las diferencias en el desarrollo según se transfirieron los embriones en día + 3 o día +5. En ambos casos, y dado que en este grupo de estudio se obtuvieron entre 5 y 10 metafases II, la media de ovocitos obtenidos, en estadio de metafase II y fecundados fue similar. Por tanto la comparación es posible, pues partimos de un número similar: una media de $7,81 \pm 1,56$ y $7,92 \pm 2,87$ ovocitos en estadio de metafase II con transferencia en día +3 y +5 respectivamente. Estos datos son mayores que la media poblacional de la SEF 2015, que es de 6,9, aunque esto se explica porque hemos realizado una selección con las condiciones ideales para el cultivo largo (6-10 metafases II).

Si nos referimos a las calidades embrionarias, podemos observar que la distribución es totalmente diferente entre ambos grupos. La clasificación de Asebir se rige por la morfología y el desarrollo embrionario, con lo que un embrión clasificado como categoría A no tiene porque mantener su desarrollo a blastocisto de categoría A en día +5. No todos los embriones tienen capacidad para llegar a estadio de blastocisto [133], aunque esta capacidad se ha dicho que tiene que ver con la morfología que presenta en los estadios mas tempranos (ASEBIR,2015). Según esta clasificación, para que un embrión sea clasificado como categoría A en día +5 no tiene porque haber sido clasificado como A en día +3, pues no se tiene en cuenta el desarrollo en las fases tempranas del desarrollo.

En esta clasificación si que se tiene en cuenta el potencial implantatorio del embrión, siendo mayor en embriones categorizados como A en ambos días de transferencia. Por tanto, podemos observar que la media de embriones A y B en transferencias en día +3 es mayor que en día +5 (+3: A:0,96±1,01 B:1,67±1,06; +5: A:0,42±0,73, B:0,95±1,02) siendo la categoría C mayoritaria en estadio de blastocisto. (+3: C:1,73±1,12; +5:C:2,07±1,19). La media de embriones totales fue menor en día +5(3,45) que en día +3(4,39).

Por último debemos incidir en que, como veremos a continuación, un embrión categorizado como A en día +3 tiene un potencial implantatorio menor que uno categorizado como A en día +5.

Deberemos tener en cuenta que la media de embriones transferidos en día +3 es de 1,74 y de 1,04 en día +5, aproximándonos a la transferencia de embrión único. La media en España es de 1,8 en día +3 según la SEF.

Refiriéndonos a las tasas, es donde vamos a poder observar como se desarrollan los embriones procedentes de muestras alteradas: Tanto la tasa de gestación, como la de gestación evolutiva es mucho mayor en transferencia en estadio de blastocisto. Sin embargo, podemos observar que la media de embriones final es menor cuando

transferimos en día +5, que es lo esperable pues no todos los embriones son capaces de formar un blastocisto [133].

La tasa de gestación fue de 35,14% en día +3 y de 53,92% en día +5, mientras que la gestación evolutiva fue de 33,49% y de 46,56% respectivamente. Fue por tanto, mucho mayor cuando transferimos en blastocisto, a lo que tenemos que añadir que en día +5 prácticamente se alcanzó la transferencia de embrión único.

La tasa de gestación según la SEF fue en día +3 de 38,8% en el general de ciclos, y de 47,3% en día +5, datos similares a los nuestros.

La tasa de aborto fue también significativamente menor en transferencias en día +5 (día+3: 4,87%, día +5: 3,29%).

5.2.-Desarrollo embrionario de pacientes con morfología normal

Cuando las muestras seminales no presentaban alteraciones en la morfología y se realizaron los ciclos de TRA observamos que en el grupo de transferencia en día +3 la media de ovocitos fue ligeramente inferior al día +5, sin embargo la media de ovocitos en estadio de metafase II fue similar(día +3:7,70; día+5:7,85), por lo que se pudo realizar la comparación entre ambas aproximaciones de cultivo embrionario. La media, al igual que en el grupo anterior, fue superior a la de la SEF, pero es debido a que en este grupo integramos los ciclos con un número ovocitario óptimo de entre 5 y 10 metafases II.

Si observamos la distribución de las calidades embrionarias, ocurre lo mismo que cuando las morfologías están alteradas: la categorización en día +3 y día +5 no son comparables. Al igual que el caso anterior, la media de embriones categorizados como A y B es mucho mayor que en día +5, donde es mayor la clase C. Es por tanto mas difícil que un embrión en estadio de blastocisto llegue a ser clasificado de la mejor categoría.

Independientemente de la categorización, al igual que en el caso anterior la tasa de gestación y gestación evolutiva son mayores en estadio de blastocisto. Sin embargo, la media de embriones totales es solo ligeramente menor cuando realizamos el

cultivo largo: son mas los embriones que llegan a estadio de blastocisto si provienen de una muestra espermática morfológicamente normal (+3: 4,15; +5: 4,07).

La tasa de gestación en día +3 fue de 47,89% y en día +5 mayor, de 56,33%. Sin embargo, en cuanto a la tasa de gestación evolutiva aun siendo mayor en día +5 (45,07% frente a 43,60% en día +3) no ofreció unas diferencias tan acusadas.

En cuanto a la tasa de aborto, si fue estadísticamente significativa menor en la transferencia en día +5 que en día +3 (día +5:3,12%; día+3:4,76%).

5.3.- La influencia de la morfología en el desarrollo embrionario

Se ha puesto de manifiesto que en los casos en los que la morfología espermática este gravemente alterada puede afectar a la tasa de gestación y a la probabilidad de conseguir el embarazo.

En los casos en los que se realizó el cultivo en día +3, la diferencia de las tasas de gestación entre las muestras normales y las morfológicamente alteradas fue de un 10,11% mayor en las muestras normales (33,49% frente a 43,60%). Sin embargo, partiendo de una media de ovocitos similares se observo que en día +5 las tasas de gestación fueron similares (46,56% en muestras alteradas y 45,07% en muestras normales).

Cuando observamos el desarrollo en las muestras patológicas ocurrió lo mismo: cuando los embriones procedentes de estas muestras se transfirieron en día +3 obtuvimos una tasa de gestación clínica de 33,49% mientras que si se transfirieron en día +5 fue de 46,56%.

En el caso de los embriones procedentes de muestras morfológicamente normales observamos que las tasas de gestación en día +3 fue de 43,60% y en día +5 de 45,07%.

Por tanto, podemos corroborar que si a un paciente se le diagnostico una grave patología seminal a nivel de la morfología, en el caso de transferir en día +3, con

un número de ovocitos y embriones similares que en una muestra normal, la tasa de gestación era menor. Sin embargo, muestras alteradas con transferencia en día +5 dan como resultado tasas de gestación similares que las del grupo de morfología normal.

Además, debemos incidir, que en cuanto a la media de embriones, cuando las muestras normales se dejaban 2 días mas en cultivo, el número fue muy similar (4,15 en día +3 y 4,07 en día +5), mientras que en las muestras patológicas la media de embriones fue mucho menor (4,39 en día +3 frente a 3,45 en día +5).

Podemos postular, por tanto, que estos embriones que en día +3 fueron clasificados como viables no generaron embarazo, como ha quedado demostrado en la menor tasa de gestación en día +3 en embriones procedentes de muestras patológicas.

Pero al llegar al estadio de blastocisto aunque es una media menor de embriones, la tasa de gestación clínica se iguala en las muestras patológicas y las normales.

La activación del genoma embrionario se produce a partir del día +3. Alteraciones en el espermatozoide se van a ver reflejadas por la no consecución del estadio correcto de blastocisto.

Como ya se ha indicado, la activación del genoma embrionario se produce a partir del estadio de 8 células [134]. Sin esta activación, los embriones no van a seguir el desarrollo y por tanto no llegaran al estadio de blastocisto. Una vez el embrión ha llegado a ese estadio, las probabilidades de conseguir el embarazo aumentan [125] [135].

Aunque no podemos asegurar que un embrión que no se desarrolle "in vitro" no se desarrollara "in vivo", con el desarrollo de los nuevos medios y condiciones de cultivo nos hacen indicar que cada vez la aproximación es más válida [121].

Además, el análisis de los transcritos presentes en embriones antes de su implantación nos indica que los que se expresan desde el estadio de metafase II hasta las 4 células son reguladas por transcritos heredados de forma materna y los

genes que van a regular la implantación van a estar reguladas por los propios transcritos del embrión [136][137].

Por tanto, las alteraciones heredadas del gameto masculino se van a expresar a partir del día +3 de desarrollo. Como hemos demostrado, embriones que hasta el día +3 tenían un desarrollo correcto procedentes de muestras seminales alteradas a nivel morfológico no son capaces de continuar el desarrollo, con la consiguiente bajada de la tasa de gestación.

Es en estos casos cuando el cultivo a estadio de blastocisto nos va a permitir realizar una mejor selección embrionaria, pues las posibles alteraciones en la viabilidad de embrión se van a poner de manifiesto en este periodo de tiempo. Numerosos estudios han demostrado que la tasa de gestación evolutiva es mayor cuando se transfieren embriones en estadio de blastocisto [138][139].

Además, la tasa de aborto también es menor en nuestro estudio, lo que se corrobora con los datos de otros grupos [139].

6.-Pacientes con fragmentación de ADN espermático alterado y MACS

Tras la realización de un ciclo fallido de TRA en el que no se consiguió un embarazo, se indicó a los pacientes la realización de una prueba accesorio, el estudio de fragmentación del ADN espermático.

Se ha descrito que la fragmentación puede ser debida a una exposición a altos niveles de especies reactivas del Oxígeno (ROS), a daño en el paso del espermatozoide a nivel epididimario, fallos en la eliminación de los ROS o bien a la entrada en proceso de apoptosis de los espermatozoides [140][141].

Altos niveles de ROS (Superóxido, hidroxyl, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y peroxinitrito) afectan a la calidad espermática, en su motilidad, viabilidad y función

interactuando con los lípidos de la membrana de los espermatozoides y las proteínas nucleares y mitocondriales[142].

La integridad genómica puede verse afectada en ambas hebras del ADN, generándose en la meiosis, en la fase de entrecruzamiento, y posteriormente en la espermiogénesis en el momento de la sustitución de las histonas por protaminas.

Aunque se realice una valoración de la muestra seminal a nivel de concentración, motilidad y morfología espermática y los parámetros estén por encima de la normalidad, no significa que exista una integridad optima de la cromatina, el ADN no este fragmentado o bien que estén en proceso apoptótico[143].

La incorrecta compactación y deficiencias en las protaminas se ha relacionado con altos niveles de fragmentación[144].

La selección espermática por gradientes de densidad y "swim-up" nos permite obtener una cohorte de espermatozoides optima para la posterior realización de la ICSI, sin embargo con el estudio de la fragmentación del ADN espermático y la aparición de la selección inmunomagnética podemos descartar los espermatozoides que con la selección normal hubiésemos clasificado como normales ya que los espermatozoides que estén en proceso de apoptosis van a expresar fosfatidil serina en la membrana, a través de la cual van a ser inmovilizados en una columna sometida a un campo magnético, el MACS[145].

Cuando se obtuvo un IFE alterado se realizo la técnica de MACS. Esta técnica nos permite seleccionar los espermatozoides que no están en estado de apoptosis mediante un campo magnético. Al seleccionar estos espermatozoides, buscamos obtener unas mejores tasas de gestación, pues desgraciadamente, la ICSI solo nos permite seleccionar espermatozoides por su morfología. Hay varios grupos de estudio ,como Bochev [146] y Bucar [147] que han registrado mejores resultados en muestras seminales con la fragmentación alterada realizando el MACS, así como mejores tasas de gestación.

Por tanto, comparamos muestras morfológicamente alteradas que también habían obtenido un porcentaje de fragmentación del ADN espermático considerado como

patológico (>27%), y se generaron dos grupos, con transferencia en día +3 y en día +5.

En cuanto a las transferencias en día +3, tanto en muestras con morfología patológica como en muestras con morfología normal se obtuvieron una media de ovocitos similar, así como en estadio de metafase II ($5,83 \pm 1,17$ y $5,55 \pm 2,32$). Es un número inferior a la media de la SEF (6,9) pero está en concordancia con otros estudios como el de Troya (148), de 5,99 donde se utilizó la técnica de MACS.

Se observó que la tasa de fecundación fue menor en los casos procedentes de muestras normales, pero sigue siendo una tasa de fecundación dentro de lo esperado.

De la misma forma, encontramos una media de embriones menor en los pacientes con muestra normal, y como consecuencia una media de embriones de calidad A y D menores.

Sin embargo, una vez nos centramos en la tasa de gestación clínica, fueron muy similares en ambos grupos: 29,41% y 27,27% ligeramente menor en pacientes con muestras con morfología normal, lo esperable después de haber obtenido una media de embriones también menor.

Esto contrasta con los resultados que habíamos obtenido anteriormente en pacientes en los que no se había realizado el estudio de fragmentación del ADN espermático: en ese caso, los pacientes con morfología espermática alterada la tasa de gestación fue significativamente menor que en pacientes con morfología normal.

Los datos obtenidos son coherentes con otros estudios que reflejan tasas similares, como el de Troya [148] con una tasa de gestación de 27,3%.

Son muchos los grupos que han propuesto el uso de MACS de forma rutinaria para mejorar la selección espermática tras la capacitación. Esta técnica reduce de forma eficiente la fragmentación y separa los espermatozoides apoptóticos del resto [149] [150] [151].

Por otra parte separa las caspasas, que pueden inducir la apoptosis en el espermatozoide [152].

Por último, tal y como se ha puesto de manifiesto, el MACS selecciona también espermatozoides con mala morfología [153][154]. La similitud de tasas de gestación del ciclo con morfologías alteradas y morfologías normales es debida a la selección que realiza el MACS.

Con respecto al grupo de transferencias en día +5, el número de ciclos no nos permitió realizar un estudio estadístico en profundidad, pero si pudimos observar resultados concluyentes.

Como era de esperar la media de ovocitos fue mayor que en el grupo de transferencia en día +3; sin embargo la media obtenida en muestras con morfología normal fue menor, probablemente debido al menor número de ciclos.

Debido a esto, la media de ovocitos, la media de ovocitos en estadio de metafase II y el número de ovocitos fecundados fue menor en pacientes con muestras normales.

Sin embargo, las tasas de gestación fueron superiores a las obtenidas en transferencia en día +3: 39,13% y 37,55%.

Por tanto, la consecución de embriones en estadio de blastocisto nos aporta un aumento en las tasas de gestación.

Al igual que en el grupo de MACS con transferencia en día +3, no hubo diferencias significativas dependiendo si la morfología estaba alterada o no.

Por tanto el MACS se postula como una técnica de selección espermática no solo a nivel de la fragmentación del ADN espermático, sino a nivel de la morfología espermática. Estudios como el de Nadalini [155] o Van Thillo [156] apuntan a esta dirección, mientras que otros, como el de Gil [157] apuntan a que no varía la tasa de aborto, pero si aumentan la tasa de gestación.

7.-Pacientes sometidos a TESE

Se estima que aproximadamente el 2% de la población no poseen espermatozoides en eyaculado [158] y, aproximadamente el 10% de los pacientes que acuden a realizar un ciclo de TRA son azoospermicos [159].

La azoospermia se puede clasificar clínicamente como Obstructiva, o No Obstructiva.

La azoospermia No obstructiva puede ser debida a efectos de fármacos, problemas genéticos, patologías como varicocele y testículos en ascensor, radiación u otros factores que pueden afectar a la producción espermática. Se estima que la recuperación espermática es del 60% en estos casos [160][161].

La azoospermia Obstructiva puede ser debida a infecciones, accidentes, anomalías congénitas o intervenciones como la vasectomía. La recuperación espermática es cercana al 100% en estos casos [160][161].

Tras la exploración física, análisis hormonal y genético, y revisión de la historia medica se puede determinar el tipo de azoospermia. En el caso de un paciente que quiere perpetuar su estirpe genética, la intervención quirúrgica es la opción mas eficaz en estos casos.

La recuperación espermática por intervención quirúrgica fue realizada por primera vez en 1995 por Devroey para la realización de un TRA, aunque el 1993 Tournaye ya había obtenido espermatozoides viables por biopsia.

Existen varias técnicas, como son el PESA (aspiración espermática del epidídimo), TESA (Aspiración espermática en el testículo) o TESE (extracción espermática en el testículo). En nuestro centro, está protocolarizado el uso del TESE.

Dado que el número de células espermáticas obtenidas por estos métodos invasivos son bajas, la selección espermática va a estar limitada a la hora de realizar la técnica de ICSI.

La morfología espermática es el mejor criterio a la hora de seleccionar los espermatozoides procedentes de biopsia [162], aunque va a ser la motilidad la que

nos va a ayudar en la selección. Yovich introdujo el uso de la Pentoxifilina en los TRA, y Tasdemir la aplicó a muestras obtenidas quirúrgicamente del testículo. Se demostró que la adición de la Pentoxifilina no solo activaba la movilidad de los espermatozoides, inhibiendo la fofodiesterasa e incrementando los niveles de AMPc [163], sino que además aumentaba la tasa de fecundación [164].

En nuestro estudio se incluyeron los casos de pacientes sometidos a TESE por factor obstructivo, tras lo cual se criopreservó el tejido testicular. Se realizó la técnica de ICSI y a la muestra seminal, una vez descongelada, se le adicionó Pentoxifilina. En estos casos se tuvo en cuenta el día de la transferencia en día +2, +3 y +5.

En cuanto al número de ovocitos obtenidos podemos observar que hay una gran diferencia entre los 3 grupos: mientras que cuando se realizó la transferencia en día +2 y día +3 la media fue similar ($7,85 \pm 3,93$ y $9,96 \pm 4,22$ respectivamente) cuando se realizó cultivo en estadio de blastocitos la media fue mayor, de $17,06 \pm 7,91$). Esto es debido a que el cultivo a estadio de blastocisto se ha realizado en un número de casos reducidos (16), de forma bastante conservadora y solo cuando el número de embriones correctamente fecundados fue alto ($7,13 \pm 4,43$).

En estos grupos de estudio podemos observar que cuando se transfirieron en día +2 la tasa de fecundación fue muy baja: 26,9%, que se corresponde con un número de embriones fecundados de $1,83 \pm 1,14$. Dado que el número de embriones fecundados correspondía con el número de embriones a transferir, y no se iba a poder realizar selección embrionaria.

En cuanto a las tasas de fecundación de día +3: 48,82% y día +5: 55,33%; éstas se ajustan a los datos obtenidos por otros grupos de estudio que inciden en que la tasa de fecundación es menor que en muestras procedentes de eyaculado. Kovacic en 2006 reportó una tasa del 50,9%, Ketabchi [165] del 58,82%, Vaduba del 66,6% (2016)[166] aunque otros grupos han reportado tasas de fecundación similares a las de ICSI, de un 90% [167].

Si nos referimos a las calidades embrionarias vemos que hay diferencias en los tres grupos: la media de los embriones fue mucho menor en el grupo con transferencia en día +2, y porcentualmente se obtuvieron más embriones de calidad C.

En cuanto al grupo de transferencia en día +3, es donde porcentualmente nos encontramos mas embriones de calidad B, y en día +5 de calidad C. En este caso la comparación de medias nos dió diferencias significativas entre todos los grupos, dato esperable pues la media de embriones finales fue muy diferente entre ellos: día +2: $1,91 \pm 1,01$; día +3: $2,75 \pm 1,91$ y día +5: $3,94 \pm 3,94$. Por tanto, al observar las diferencias por distribución, podemos ver, que al igual que en ciclos de eyaculado en fresco, la mayoría de embriones clasificados como C se observan en cultivo largo (63,43% de embriones en estadio de blastocisto son de esta calidad).

Aunque la tasa de fecundación fue menor que en ciclos de ICSI, al observar las tasas de gestación vemos que son muy cercanas a los datos de muestra procedente de eyaculado.

Si bien es cierto que la tasa de gestación de los embriones transferidos en día +2 fue de 29,5%; la tasa de gestación de transferencia en día +3 fue de 40,03%, muy similar a la tasa de gestación general en día +3, de 39,06%. Si se transfirió en estadio de blastocisto fue de 56,2% mientras que la tasa de gestación general en día +5 fue de 52,48%. Son tasas similares a las muestras procedentes de eyaculado, tal y como han descrito otros grupos lo cual certifica que aunque la tasa de fecundación es mas baja, la tasa de gestación no lo es [166][168][169]. Tsai reportó una tasa de gestación del 38,1%, Ketabchi del 31,7%, y Popal del 38,2%.

Por último, debemos mencionar que la selección por morfología embrionaria una vez más nos remite resultados aun mejores, ya que en el caso de transferir embriones categorizados como A y B las tasas aumentan (día +2: 44,4%; día +3: 46,51% y día +5: 50%).

Podemos decir por tanto, que aunque el número de ovocitos fue diferente en los tres grupos a estudio, y que la tasa de fecundación fue menor que en un ciclo normal, ciclos con muestras procedentes de tejido testicular pueden verse beneficiados del

cultivo a estadio de blastocisto, pues la selección embrionaria en el cultivo nos va a permitir mejorar las tasas de gestación .

7.1.-Pacientes sometidos a TESE por alta fragmentación espermática

El último grupo a estudio estuvo comprendido por pacientes con un índice de fragmentación espermática muy alterado, que tras un ciclo de ICSI con realización de MACS sin resultado positivo fue sometido, tras la punción folicular, a un TESE.

Moskovtsev en 2010 puso de manifiesto que los espermatozoides obtenidos directamente del tejido testicular poseían una integridad del ADN mayor que los procedentes de eyaculado [170]. Otros estudios inciden en el mismo aspecto [171]. Al atravesar los espermatozoides a el epidídimo, donde puede haber altos niveles de ROS, es donde pueden producirse cortes en la estructura del ADN [172].

Por tanto, el uso de estos espermatozoides procedentes de TESE pueden mejorar las tasas de gestación en pacientes con alto grado de fragmentación. Si la tasa de fragmentación del ADN espermático a nivel testicular es menor, como refleja la bibliografía, las probabilidades de seleccionar un espermatozoide con una mayor integridad de ADN es mayor que si utilizásemos los espermatozoides procedentes de eyaculado. Greco (2005) fue el primero en utilizar este protocolo, y obtuvo una tasa de gestación del 44%. Sin embargo, hay pocos grupos que estudien este tipo de pacientes y que realicen TESE por alto grado de fragmentación [173].

En nuestro caso, y al igual que en TESE por patología obstructiva se tuvo en cuenta la transferencia en día +2.

Sin embargo, podemos observar que aunque las medias de ovocitos obtenidos según el día de transferencia fue diferente (día +2 $8,00 \pm 3,97$; día+3 $11,56 \pm 3,01$; día+ $513,33 \pm 6,35$), son valores similares a los de los ciclos con eyaculado en fresco. Además, un factor de inclusión en el programa de TESE en fresco por

elevado IFE fue el disponer de al menos 5 ovocitos en metafase II para realizar la intervención.

En cuanto al número de embriones totales, es en transferencia en día +2 , igual que en el caso anterior, fue de $1,67 \pm 0,77$: dado que no había posibilidad de selección embrionaria, se transfirieron en ese día de ciclo. Por otra parte, la media de embriones en día +3 y día +5 fue la misma: de 3 embriones por ciclo. Teniendo en cuenta que partíamos de un número de ovocitos mayor en los ciclos que se transfirieron en día +5, es el valor esperado. Podemos comparar también con el número de embriones obtenidos en día +5 (cuando se trataba de muestras con morfologías patológicas), que fue de 3,21 por ciclo. Por tanto, una media de 3, aun siendo similar en un ciclo en fresco es menor: se ha producido una selección embrionaria mayor en el cultivo en el laboratorio.

La tasa de fecundación (día 2: 32,20%; día 3: 56,93%; día 5: 57,44%) es comparable con las tasas obtenidas por TESE sin indicación por IFE: inferiores a las reflejadas por ICSI convencional.

Si nos referimos a las tasas de gestación ocurre lo mismo, con muestras procedentes de biopsia testicular las tasas de fecundación son menores, pero las de gestación son similares a las generales. En día 2 se obtuvieron un 38,46, en día +3 del 38,88% y en día +5 del 66,6%, aunque tenemos que tener en cuenta el bajo número de casos en este subgrupo (3 casos).

Esteves [174] ya reflejó una tasa de gestación del 40% en día +3, similar a la nuestra. Además, en otro estudio obtuvo mejores resultados con respecto a la tasa de gestación utilizando los espermatozoides de testículo que procedentes de eyaculado (40,75 frente a 8,3%).

Cabe por último reflejar la baja tasa de aborto: del 5,55% en día +3 y del 0% en día +5.

8.-Análisis multivariante de la población de estudio

Son muchos los estudios que han intentado proponer un algoritmo pronóstico para pacientes sometidos a ciclos de reproducción asistida, con el objetivo de informar a los pacientes de sus opciones reales de conseguir un niño en casa.

Aunque estudios sobre la fertilidad de una población se habían realizado con anterioridad [175] Kauffmann aplicando los avances en redes neuronales en 1998 fue el primero en proponer un sistema basado en los éxitos de los TRA hasta esa fecha [176].

Desde entonces, varios grupos basándose en diferentes aspectos relacionados con los TRA han ido exponiendo sus resultados: Meseguer, en 2011 se basó en los tiempos de división celular; Gardner (2010) en el nivel de Oxígeno de las condiciones de cultivo; Conagahn (2013) en el número de embriones y en su capacidad de llegar a estadio de blastocisto, etc.[178][179][180]

En nuestro estudio se introdujeron los datos obtenidos en el laboratorio con el fin de averiguar si aparecían factores pronósticos de un buen resultado del ciclo.

Tras la realización del cálculo estadístico fueron los siguientes aspectos los que nos ofrecieron un buen valor pronóstico:

- Calidad seminal: Como se ha puesto de manifiesto en este estudio, una morfología alterada nos dio menores tasas de éxito en día +3. Estos datos son los esperados si observamos otros estudios como los de Chapuis [85], Sharma [181], Gaskins [182], Niu [183].
- Ovocitos obtenidos: Un buen número de ovocitos va a optimizar la selección embrionaria en el laboratorio. Ahmed [184], Nagy [185], Oliveira [186], Vaughan [187], Milachich [96].
- Día de la transferencia: La transferencia en estadio de blastocisto mejoró las tasas de gestación. Sotirovska [116], Zhang [188], Men [189].

- Embriones transferidos de Calidad A y B: Una buena selección embrionaria por morfología aumenta la tasa de gestación. Milachich [96], Figueira [190] ASEBIR (2015).
- Edad: La edad es un factor que afecta negativamente a la tasa de éxito de un ciclo de TRA. Numerosos estudios como el de Scheffer [191], Pokulniewicz [192], Isa [193] o Tan [194].

Por tanto, con estos resultados es posible dar una información pronóstica a pacientes que se van a someter a un ciclo de TRA según sus posibilidades de conseguir un niño en casa.

CONCLUSIONES

1.-Conclusiones

Tras el estudio de los ciclos realizados, haber realizado los análisis estadísticos pertinentes y discutido y argumentado los datos obtenidos, pudimos concluir:

1. La morfología espermática afecta al desarrollo embrionario: embriones generados con muestras morfológicamente alteradas alcanzan menor tasa de evolución a día + 5, por tanto, los pacientes con graves alteraciones en la morfología espermática se ven beneficiados de realizar el cultivo largo (estadio de blastocisto), pues los embriones que se transferirían en día +3 si no activan su genoma adecuadamente no son capaces de producir un embarazo.
2. Si tenemos en cuenta el índice de fragmentación (alterado) el beneficio se incrementa en el cultivo largo, puesto que la influencia de la morfología alterada sobre la tasa de gestación se minimiza: el MACS nos permite excluir espermatozoides con morfología alterada.
3. En pacientes con azoospermia obstructiva la transferencia en día +3 y +5 nos ofrece unas tasas de gestación similares a las de muestras de espermatozoides procedentes de eyaculado, aunque la tasa de fecundación es menor. Por tanto la realización de cultivo largo es válida, pero en punciones con recuperado ovocitario alto. La baja tasa de gestación en transferencias en día +2 nos indica que parece poco oportuno mantener esta rutina en el laboratorio: no aporta suficiente información sobre el potencial del desarrollo embrionario.
4. Por tanto, podemos concluir que la morfología espermática, la edad de la paciente, el día de la transferencia, el número de ovocitos obtenidos y la media de embriones calidad A y B transferidos son factores con un valor pronóstico estadísticamente significativo.

El correcto diagnóstico de las alteraciones espermáticas nos puede ayudar a optimizar los ciclos con respecto a obtener un niño en casa en el menor plazo posible, ya que en punciones foliculares con un número de ovocitos en metafase II entre 5 y 10 el cultivo largo nos ofrece los mejores resultados, independientemente de las alteraciones seminales. Se debería plantear como técnica más adecuada en los laboratorios de RA hoy en día, siempre que se dispongan de los medios y condiciones adecuadas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Las perspectivas futuras en el ámbito de la Reproducción Asistida, concretamente en la andrología y la embriología son más amplias que nunca. Las sociedades de estudio como la ESHRE, SEF o ASEBIR integran cada vez más centros especializados, pues los casos de infertilidad están creciendo en nuestra sociedad, aunque también son mayores los éxitos conseguidos. Por tanto, estudios de centros de todo el mundo nos van ayudar en como mejorar las tasas en los laboratorios de RA.

En cuanto a los estudios sobre el espermatozoide, en fechas próximas se pasará de estudiar únicamente la morfología “exterior” a la morfología “interior”: llegará un momento en que estudios diagnósticos como el FISH o la fragmentación del ADN espermático dejen de serlo para poder realizar una selección directa del espermatozoide adecuado y óptimo. Además, con el desarrollo de técnicas informatizadas para el conteo y valoración de parámetros seminales, los diagnósticos serán mas certeros. Hoy en día sistemas de conteo y valoración espermática informatizada son motivo de debate en cuanto a su eficiencia pero con el desarrollo tecnológico serán el futuro de la andrología: desarrollo de patrones morfológicos y de movilidad para seleccionar las mejores poblaciones espermáticas.

Por otra parte, las condiciones del laboratorio han permitido mejorar la selección embrionaria y por tanto aumentar las tasas de éxito. La mejora de estas condiciones de cultivo van a propiciar que el cultivo a estadio de blastocisto se normalizará en los laboratorios de RA. La informática también ayudará: algoritmos de desarrollo embrionario nos ayudarán a seleccionar el mejor embrión más allá de las capacidades del ser humano. Los equipos de vigilancia continua son sólo un primer paso: en poco tiempo se convertirán en la mejor herramienta en manos del embriólogo.

Por último, tras la realización de este estudio y contrastar las publicaciones de otros grupos podemos establecer que:

- Muchos grupos de estudio no consideran la morfología espermática como un parámetro clave a la hora de planificar un ciclo de RA. El tipo de cultivo o el planteamiento de FIV convencional puede ayudar a aumentar las tasas de éxito.
- El MACS no mejora las tasas de gestación: sigue estando en debate su utilización. Si que se demuestra que la selección espermática se optimiza.
- La biopsia testicular es la mejor opción en pacientes con azoospermia obstructiva, una vez hemos observado los resultados. Sin embargo, al menos en pacientes sometidos a vasectomía, estos cada vez más son informados de la posibilidad de la criopreservación de muestra seminal para un uso futuro.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]Zarinara et al; Models Predicting Success of Infertility Treatment: A Systematic Review. 2016 J Reprod Infertil.;17(2):68-81
- [2]Kremer J. The significance of Antoni van Leeuwenhoek for the early development of Andrology. Andrologia. 1979; 11:234- 49.
- [3]Guttmacher (1943), Guttmacher AF. The Role of Artificial Insemination in the Treatment of Human Sterility. Bull N Y Acad Med. 1943;19(8):573-91.
- [4]Stoughton (1948) Stoughton RH. Artificial human insemination. Nature. 1948; 13;162(4124):790.
- [5]Kohlberg (1953) Kohlberg K. Artificial insemination and the physician. Dtsch Med Wochenschr. 1953;78:855-6.
- [6]Philips y Lardy;Phillips EJ, Lardy HA. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. J Dairy Sci. 1940;23:399-404.
- [7]Step toe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. Lancet. 1978;12;2(8085):366.
- [8]Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet.1992; 340:17-18.
- [9] Van Steirteghem et al; High fertilización and implantation rates after intracytoplasmaticis sperm injection. Hum Reproduction 1993b;8; 106 1-6

-[10]Jungwirth et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. Eur Urol. 2012 Aug; 62(2):324-32. Epub 2012 May 3.

-[11]Kruger et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil. Steril. 1988, 46, 1118-1123.

-[12]Oehninger, S et al. Intracytoplasmic sperm injection: achievement of high pregnancy rates in couples with severe male factor infertility is dependent primarily upon female and not male factors. Fertil Steril. 1995 Nov; 64(5):977-81.

-[13]Engisu, M.E., Dumoulin, J.C.M., Pieters, M.H.E.C. et al. Predictive value of morphologically normal sperm concentration in the medium for in-vitro fertilization. Int. J. Androl. 1993, 16, 113-120.

-[14]Mashiach S, et al. Failure to fertilize in vitro in couples with male factor infertility: what next? Fertil Steril. 1992 Jul;58(1):187-9.

-[15]Barrett et al; Outcomes oriented research in a IVF program: transfer catheter type affects IVF outcome. Proceedings of the 53 annual meeting of the ASRM.

-[16]Gao et al; Widely predicting specific protein functions based on protein-protein interaction data and gene expression profile. Sci China C Life Sci 50(1):125-34

-[17]Bonde et al; Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. Lancet. 1998 Oct 10;352(9135):1172-7.

-[18]Garret, C. Et al. Selectivity of the human sperm± zona pellucida binding process to sperm head morphometry. Fertil. Steril. 1997, 67, 362±371.

- [19]Eliasson, R. Standards for investigation of human semen? *Andrologia*, 3, 49–64. 1971
- [20]Zinaman et al; Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl*. 2000 Jan-Feb;21(1):145-53.
- [21]Guzick et al; Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001 Nov 8;345(19):1388-93.
- [22]Ombelet,W;Robays J; Artificial insemination history: hurdles and milestones *Facts Views Vis Obgyn*, 2015, 7 (2): 137-143 2015
- [23] WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Fifth edition. 2010.
- [24]Kruger, et al, Sperm morphologic features as a pronostic factor in in vitro fertilization. *Fertil steril* 2003. 9(1).
- [25]Zinaman et al; Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl*. 2000 Jan-Feb;21(1):145-53.
- [26]Larson et al. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod*. 2000 Aug;15(8):1717-22.
- [27]Saraswat et al; Human Spermatozoa Quantitative Proteomic Signature Classifies Normo- and Asthenozoospermia. *Mol Cell Proteomics*. 2017 Jan;16(1):57-72
- [28]Yovich, J.L. and Stanger, J.D. The limitations of in vitro fertilization from males with severe oligozoospermia and abnormal sperm morphology. *J. In Vitro Fertil*. 1984; *Embryo Transfer*, 1, 172–179.

- [29]Ron-El, R., Nachum, H., Herman, A. et al. Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertil. Steril.*1991, 55, 338–344.
- [30]Parinaud, J., Mieusset, R., Vieitez, G. et al. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil. Steril.*1993, 60, 888–892.
- [31]Keegan Br et al; Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmica sperm injection. *Fertil Steril.* 2007 Dec;88(6):1583-8. Epub 2007 Apr 19.
- [32]Koetzee en 1998 Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review *Human Reproduction Update* 1998, Vol. 4, No. 1 pp. 73–82.
- [33] Ryu et al; Increased chromosome X, Y, and 18 nondisjunction in sperm from infertile patients that were identified as normal by strict morphology: implication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2001 Nov;76(5):879-83.
- [34]Ramasamy et al; Reproductive outcomes in men with karyotype abnormalities: Case report and review of the literature. *Can Urol Assoc J.* 2015 Sep-Oct;9(9-10)
- [35]Said TM, Land JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum Reprod Updat.* 2011;17(6):719–33.
- [36]Yan,et al; Effect of luteinizing hormone variation on clinical outcomes in patients with polycystic ovarian syndrome undergoing in vitro fertilization-embryo transfer using standard long protocol. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2016 Mar;36(3):381-5.
- [37]Riedel et al; Minimal andrological requirements for in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1989 Nov;4(8 Suppl):73-7.

- [38]Hoffman et al; Die formstörungen der spermatozoen im sperma und zervikalschleim als spiegel testikulärer erkrankungen. Gynäkologe, 18,1985; 189–192.
- [39]Shen et al; Pentoxifylline stimulates human sperm motility both in vitro and after oral therapy. Br J Clin Pharmacol. 1991 Jun;31(6):711-4.
- [40]Snell, WJ; The molecules of mammalian fertilization Cell. 1996 May 31;85(5):629-37.
- [41]Primakoff et al; Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. J Cell Biol. 1987 Jan;104(1):141-9.
- [42]Stein et al; Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. J Cell Sci. 2004 Dec 15;117(Pt 26):6269-74.
- [43]Buffone,et al; Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. Biochim Biophys Acta. 2014
- [44]Klinovska, et al; Sperm-egg fusion: a molecular enigma of mammalian reproduction. Int J Mol Sci. 2014 Jun 13;15(6):10652-68.
- [45]Tosti E, Ménézo Y. Sperm induced oocyte activation. In: Lejeune T, Delvaux P(eds). Human Spermatozoa: Maturation, Capacitation and Abnormalities. New York: Nova Biomedical Books, Science Publishers Inc, 2010.
- [46]Tesarik J, Sousa M. More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore.Fertil Steril 1995;63:343–349.
- [47]Sugaya S. Pregnancy following calcium ionophore oocyte activation in an

oligozoos- permia patient with repeated failure of fertilization after ICSI. Clin Exp Obstet Gynecol 2010;37:261–262.

-[48]Milki et al; Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. Fertil Steril. 2000 Jan;73(1):126-9.

-[49] Dewsbury D. A. 1982Ejaculate cost and male choice. Am. Nat. 119, 601–610

-[50]Garcia Vázquez et al; Morphometry of boar sperm head and flagellum in semen backflow after insemination. Theriogenology. 2015.

-[51]Lopez-Ubeda et al; Oviductal epithelial cells selected boar sperm according to their functional characteristics. Asian J Androl, 27. 2016.

-[52]Poiani et al; 2006; Complexity of seminal fluid: a review. Behav. Ecol. Sociobiol. 60, 289–310.

-[53] Gormendio et al; Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. Int J Dev Biol. 52. 2008.

-[54]Roldan et al; Sperm competition promotes asymmetries in reproductive barriers between closely related species.Evolution.vol 63,613-623 2009.

-[55]Mossman et al; Sperm speed is associated with sex bias of siblings in a human population. Asian J Androl. Vol 15(1) 2013.

-[56]Katz et al; Morphometric analysis of spermatozoa in the assesment of human male fertility. Jul-Aug;7(4):203-10J Androl. 1986.

-[57]Franzen et al, On spermiogenesis, morphology of the spermatozoa and spermiogenesis. Comparative spermatology New York. 1977.

- [58]Tourmente et al; Mass-specific metabolic rate and sperm competition determine sperm size in marsupial mammals. Plos One, 6(6) 2011.

- [59] Estes et al; Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer epididymal sperm samples. J Androl (5) 662-70 2006.

- [60]Bedford et al; Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. Biol Rep 1983. Feb 28(1) 108-2'.

- [61]Hernandez-Caravaca et al; Boar sperm with defective motility are discriminated in the backflow moments after insemination. Theriogenology. 2015.

- [62]Ramon et al; Sperm population structure and male fertility: an intra-specific study of sperm design and velocity in red deer. Biol Reprod.(7)110 2013.

- [63]Tourmente et al; Mass-specific metabolic rate and sperm competition determine sperm size in marsupial mammals. Plos One, 6(6) 2011.

- [64]Malo et al; Sperm design and sperm function. Biol Lett 2(2) 246-9. 2006

- [65]Ros Santaella et al; Sperm flagellum volume determines freezability in red deer spermatozoa. PLoS One. 2014. Nov 7;9(11)

- [66]Humpries et al; Sperm competition: linking form to function BMC Evol Biol. Nov 25;8:319.

- [67]Humpries et al; Influence of race and ethnicity on in vitro fertilization outcomes: a systematic review. Am J Obstetric & Gynecologist. 2016; 212-212b.

- [68]Davis et al; Automated morphometric analysis of stallion Am J Vet Res.1993 Nov;54(11):1808-11.
- [69]Maree et al; Quantification and identification of sperm subpopulations using computer aided sperm analysis and species-specific cut off values for swimming speed. Biotech Histochem.2013. May;88(3-4):181-93.
- [70]Gravance et al; Pre-freeze bull sperm head morphometry related to post-thaw fertility.Anim Reprod Sci. Aug;114(1-3):81-8.
- [71]Maroto-Morales et al; Current status and potential of morphometric sperm analysis. 2016 Asian J Androl. Nov-Dec;18(6):863-870.
- [72]Morrell et al; Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. Vet Med Int. 2010 Aug 4;2011.
- [73]Bjorndahl et al; How to count sperm properly: checklist for acceptability of studies based on human semen analysis.Hum Reprod.2016. Feb;31(2):227-32.
- [74]Henkel et al; DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology 2003. Reprod Biomed Online.Oct-Nov;7(4):477-84.
- [75]Hyacinth et al; Ficoll-400 density gradient method as an effective sperm preparation technique for assisted reproductive techniques. J Hum. Reprod Sci. 9,194-199. 2016
- [76]Bartoov et al; Real time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome.J Androl. 2002. Jan-Feb;23(1):1-8.
- [77]Yamanaka et al; Combination of density gradient centrifugation and swim-up methods effectively decreases morphologically abnormal sperms

J Reprod Dev. Dec 20;62(6):599-606.

-[78]Piombioni et al; Ultraestructural and DNA fragmentation analyses in swim-up selected human sperm.Arch Androl.2006. Jan-Feb;52(1):51-9.

-[78]Xue et al; Subcellular site of antispermatogenic effec of gossypol ant its posible molecular mechanism of action.Sci Sin B1983. Jun;26(6):614-33.

-[79]Morrell et al; Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency.Vet Med Int. 2010 Aug 4;2011.

-[80]Van Steirteghem et al; Use of assisted fertilization. Hum Reprod. 1993 Nov;8(11):1784-5.

-[81]Eum et al; clinical outcomes of single versus doublé blastocyst transfer in fresh and vitrified warmed cycles.Clin Exp Reprod Med.Sep;43(3):164-8.

-[82]Lee et al; Detection of early cleavage embryos improves pregnancy and delivery rates of day 3 embryo transfer during in vitro fertilization Taiwan J Obstet Gynecol.2016. Aug;55(4):558-62.

-[83]Zheng et al; ICSI treatment of severe male infertility can achieve prospective embryo quality compared with IVF of fertile donor sperm on sibling oocytes Asian J Androl.2015.Sep-Oct;17(5):845-9.

-[84] Sociedad Española de la Fertilidad.

-[85]Chapuis 2016 Sperm quality and paternal age: effect on blastocyst formation and pregnancy rates.Basic Clin Androl. 2017.Jan 21;27:2.

-[86]Luz et al; Association between number of formed embryos, embryo morphology and clinical pregnancy rate after ICSI.Rev Bras Ginecol Obstet. 2016.

Sep;38(9):465-470.

-[87]Rackwsky et al; National collection of embryo morphology data into Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System: associations among day 3 cell number, fragmentation and blastomere asymmetry and live birth rate.. Fertil Steril 2011 95 (6) 1985-1989.

-[88]Van Loenersloot et al; Prediction models in vitro fertilization; where are we? A mini review. 2014 J Adv Res. 2014 May;5(3):295-301

-[89]Drevreker et al; Selection of good embryos for transfer depends on embryo cohort size: implications for the mild ovarian stimulation debate. Hum Reprod. 1999 Dec;14(12):3002-8.

-[90]Opshal et al; The number of embryos available for transfer predicts successful pregnancy outcome in women over 39 years with normal ovarian hormone reserve testing. J Assist Reprod Genet. 2001. Oct;18(10):551-6.

-[91]Mantovani et al. Association between number of formed embryos, embryo morphology and clinical pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. Rev. Bras ginecol. Obstet. 2016. 38, 465-470.

-[92]Bodri et al; Influence of different oocyte insemination techniques on early and late morphokinetic parameters: retrospective analysis of 500 time-lapse monitored blastocyst. Fertil Steril. Nov;104(5):1175-81.

-[93]Stimpfel et al; Comparison of GnRh agonist, GnRh antagonist and GnRh antagonist mild protocol of controlled ovarian hyperstimulation in good prognosis parents. Int J Endocrinol. 2015

- [94]Sunkara et al; Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 cycles. Hum Reprod.2011 Jul;26(7):1768-74.
- [95]Timeva et al; Correlation between number of retrieved oocytes and pregnancy rates after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. ScientificWorld Journal. 2006. Jun 21;6:686-90.
- [96]Milachich et al; Are there optimal numbers of oocytes, spermatozoa and embryos in assisted reproduction?BRA Assist Reprod. 2016 .Aug 1;20(3):142-9
- [97]Karahman ; Complications and their management in endometriosis surgery. Womens Health (Lond). 2015 Aug;11(5):685-92.
- [98]Mendelbaum et al; embryo and oocyte cryopreservation .Hum Reprod. Dec;15 Suppl 4:43-7.2000 Review.
- [99]Borges et al; miR-142-3p as a biomarker of blastocyst implantation failure-Apilot study 2016 JBRA Assist Reprod. Dec 1;20(4):200-205.
- [100]Kruger, et al, Sperm morphologic features as a pronostic factor in in vitro fertilization. Fertil steril 2003. 9(1)
- [101]Zhu et al; ICSI improves fertilization in isolated tetratozoospermic men: a study with stricly controlled external factor san WHO-5 standard. Syst Biol Reprod Med. 2013 Feb;59(1):21-6.
- [102]Talarczyk-Desole,J. Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice? Ginekol Pol. 2017;88(2):56-60.
- [103]De placido et al; The effect of ease of transfer and typer of cathter use don

pregnancy and implantation rates in a IVF program. J Assist Reprod Genet. 2002

-[104]Bosh-Michich et al; Individualised controlled ovarian stimulation(ICOS): Maximising success rates for assisted reproductive technology patients. Reprod Biol Endocrinol.2011. 9: 82.

-[105]Cañadas, M.C.; Análisis de los resultados del diagnóstico preimplantacional en relación a la clasificación embrionaria convencional y las indicaciones para la realización de la técnica; Departamento de ginecología y obstetricia, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. 2016.

-[106]Ziebe et al; Results of intracytoplasmic sperm injection in relation to indication 1997.

-[107]Munné et al; Spontaneous abortions are reduced after preconception diagnosis of translocations. J Assist Reprod Genet.1998 15(5): 290–296.

-[108]Urbina, MT; Optimización de la Eficiencia de la Fecundación in vitro. Fertilidad y Reproducción Asistida, Edition: First, Chapter: Optimización de la Eficiencia de la Fecundación in vitro. Editorial Médica Panamericana.

-[109]Braude P; Johnson,M. Embryo research: yes or no? BMJ. 1989 Dec 2; 299(6712): 1349–1351.

-[110]Taylor et al; Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three- to four-cell stage. Mol Reprod Dev. 1997 Dec;48(4):442-8.

-[111] Kayhan et al; Unexpected drop in the ART clinic pregnancy rate Assisted Reproduction Techniques: Challenges and Management Options Published Online: 28 MAR 2012.

- [112]Scott et al; Preimplantation genetic diagnosis for elective sex selection,the IVF market economy,and the child-another long day´s journey into night? J Assist Reprod Genet. 2016. 19(9): 433–437.
- [113]Collas ,P.Modulation of plasmid DNA methylation and expresión in zebrafish embryos. Nucleic Acids Res.1998. Oct 1; 26(19): 4454–4461.
- [114]Cassuto et al; A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. Fertil Steril. 2009; 92:1616–1625.
- [115]Zheng et al; The safety of intracytoplasmic sperm injection in men with hepatitis B.Arch Med Sci 2016. Jun 1; 12(3): 587–591.
- [116]Sotirovska et al. The day of embryo transfer affect delivery rate, birth weigths, female to male ratio, and monozygotic twin rate. Taiwanese journal of obstetrics and gynecology 54 . 2015.
- [117]Kolibianakys, M; Devroey,P; No decrease occurs in the number of COCs retrieved with repeated IVF cycles Hum Reprod 2004 19 (8): 1927-1928.
- [118]Morris , S; Human embryos cultured in vitro for 14 days.Open biology, 2017.
- [119]Wong SC; Stem cells: a personal perspective.Balkan J Med Genet. 2011.
- [120]Hojnik et al. Morphokinetic characteristics and developmental potential of in vitro cultured embryos from natural cycleswith por ovarian response. Hindawi publishing vol 2016.
- [121]Maheshwahri et al; Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through

in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012 Aug;98(2):368-77.

-[122]Burrueel et al; Abnormal early cleavage events predict early embryo demise: sperm oxydative stress and early abnormal cleavage. *Sci Rep*. 4 2014: 6598. Published online.

-[123]Chatzmeletiou et al;Spindle abnormalities in normally developing and arrested human preimplantational embryos in vitro identified by confocal laser scanning microscopy. *Human reproduction*, vol 20 2005 n 3 672-8680.

-[124]Forman et al;embryos whose polar bodies contain isolated reciprocal chromosome aneuploidy are almost always euploid. *Hum Reprod*.2012 Feb; 28(2): 502–508.

-[125]Harton G; Tempest;H. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl*. 2012 Jan; 14(1): 32–39.

-[126]Yin 2015 et al; Patients with polycystic ovary síndrome have succesful embryo arrest. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(4): 6247–6251.

-[127]Chen et al; The health outcomes of human offspring conceived by assisted reproductive technologies (ART) *Dev Orig Health Dis*. 2017.

-[128]Bodri et al;2015 Gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists for controlled ovarian hyperstimulation in oocyte donors: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*.2011 95:164-9.

-[129]Nuno et al; Blastocyst development in single médium with or without renewal on day 3: a prospective cohort study on sibling donor oocytes in a time-lapse incubator. *Fertility sterility* vol 105 n3 .2015

-[130]Guarneri et al; Can we use incubators with atmospheric oxygen tension in the first phase of in vitro fertilization? A retrospective analysis. J Assist Reprod Genet. 2014, 32;77-82.

-[131]Kwon et al; Effects of Low Oxygen Condition on the Generation of Reactive Oxygen Species and the Development in Mouse Embryos Cultured in vitro. Obstetrics and Gynaecology Volume 25, Issue 5 October 1999 Pages 359–366.

-[132]Berthelot, F; Terqui, M. Effects of oxygen, CO₂/pH and medium on the in vitro development of individually cultured porcine one- and two-cell embryos. 1996. Reprod. Nutr. Dev. , 36, 241–251.

-[133]Gardner et al; Human embryo viability: what determines developmental potential and can it be assessed? J Assist Reprod Genet. 1998 Sep; 15(8): 455–458.

-[134]Yang et al; Selection of single blastocyst for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. Mol Cytogenet. 2012; 5: 24. Published online 2012.

-[135]Glujowski et al; A shared egg donor program: what is the minimum number of oocytes to be allocated? 2012. J Assist Reprod Genet. 2011 Mar; 28(3): 263–267.

-[136]Dobson et al. The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development. Hum Mol Genet. 2004;13:1461–70.

-[137]Zhang et al. Transcriptome profiling of human pre-implantation development. PLoS One. 2009; 4:e7844.

- [138]Chang et al; Cessation of Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist on triggering day: An alternative method for flexible multiple dose protocol. J Korean Med Sci. Apr; 24(2): 262–268. Published online 2009.
- [139]Gardner, DK; Lane, M. Culture systems for the human embryo. Textbook of assisted reproductive technologies. 2009.
- [140]Singh et al; does endometrial injury enhances implantation in recurrent in vitro fertilization failures? A prospective randomized control study from tertiary care center. J Hum Reprod Sci. Oct-Dec 2015; 8(4): 218–223.
- [141]Seli et al. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. Fertil Steril 2004 82,378-83.
- [142]Aaberg et al. Effect of extracellular ionized calcium, diltiazem and cAMP on human spermatozoa motility. J Urol. 1989;14: 1221–1224.
- [143]Nadalini et al; Annexin V Magnetic-activated Cell Sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: in the new approach better than the traditional one? J Assist Reprod Genet. 2014 Aug; 31(8): 1045–1051. Published online 2014.
- [144]Manochant et al. Relationship between chromatin condensation, DNA integrity and quality of ejaculated spermatozoa from infertile men. Andrologia 2012; 44:187-99 2012.
- [145]Grunewald et al. Effects of post-density gradient swim-up on apoptosis signalling in human spermatozoa. Andrologia 2010; 42 127-31.
- [146]Bochev et al. Sperm motility improvement after magnetic-activated cell sorting in men with astheno/oligo-asthenozoospermia. Hum Reprod. 2011;26:i133–i133.

- [147]Bucar et al; DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cells sorting. J Assist Reprod Genet. 2015 Jan; 32(1): 147–154. Published online 2014.
- [148]Troya, J; Zorrilla, I. Annexin V-MACS in infertile couples as method for separation of sperm without DNA fragmentation. JBRA Assited reproduction19(2) 2015.
- [149] Khalid SN, Qureshi IZ. Pregnancy rate improves in couples with unexplains infertility following intrauterine insemination (IUI) with magnetically selected non-apoptotic sperms. Fertil Steril. 2011.
- [150]Alvárez et al;. Clinical outcome using non-apoptotic sperm selection for ICSI procedures: report of 1 year experience. Fertil Steril. 2010.
- [151]Losada et al; Can MACS as a sperm preparation technique improve clinic results in patients with Kartagener syndrome? Hum Reprod. 2012.
- [152]Paasch et al; Activation pattern of caspases in human. Fertil Steril. 2004.
- [153]Aziz et al; The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. Hum Reprod. 2007.
- [154]Said et al. Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic activated cell sorting separation. Reprod Miomed online. 2006.
- [155]Nadalini et al; Annexin V Magnetic-activated Cell Sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: in the new approach better than the tradiational one?J Assist Reprod Genet. 2014 Aug; 31(8): 1045–1051. Published online 2014.

- [156]Van Thillo et al; Biological safety and live births after selection of non-apoptotic spermatozoa during ICSI. *Fertil Steril*. 2011;96 Suppl 3:S160–1.2014.
- [157]Gill TJ., 3rd Immunogenetics of spontaneous abortions in humans. *Transplantation*. 1983 Jan;35(1):1–6.
- [158]Willott GM. Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int* 1982;20:9e10.
- [159]Jarrow,JP. Seminal vesicle aspiration in the management of patients with ejaculatory duct obstruction . *J Urol*. 1994 Sep;152(3):899-901.
- [160]Tournaye et al. Recent concept in the management of infertility because of non obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 10,1997. 115-119
- [161]Botros et al. Medical and surgical management of male infertility. First ed, New Delhi 2014.
- [162]De vos et al. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* ,2003, 79 42-48.
- [163]De Turner et al. Effect of two phosphodiesterase inhibitors, cyclic adenosine 3-5 monophosphate and a beta-blocking agent on human sperm motility. *Fertil Steril* 29(3). 1978.
- [164]Terriou et al. Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy and birth after ICSI. *J. Assist. Reprod Genet*. 17. 2000.
- [165]Ketabchi A; Intracytoplasmic Sperm Injection outcomes with freshly ejaculated sperms and testicular or epididymal sperm extraction in patients with idiopathic

cryptozoospermia. *Nephrourol Mon.* Nov; 8(6): e41375. Published online 2016.

-[166]Vaduba et al. Pregnancy resulting from IMSI after testicular biopsy in a patient with obstructive azoospermia. *Rom J Morphol Embryol* 2016, 57. 2016

-[167]Tsai et al 2015 Clinical outcomes and development of children born to couples with obstructive and nonobstructive azoospermia undergoing testicular sperm extraction-intracytoplasmic sperm injection: A comparative study. *Taiwanese journal of obstetrics & Gynecology* 54.2015.

-[168]Popal 2013. Laboratory processing and intracytoplasmic sperm injection using epididymal and testicular spermatozoa: what can be done to improve outcomes? *Clinics (Sao Paulo)*. 68 Suppl 1:125–30. 2013.

-[169]Weissman et al; Pregnancies and live births following ICSI with testicular spermatozoa after repeated implantation failure using ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2008.17(5):605–9.

-[170]Moskevtssev et al ;Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment. *Fertil Steril* 2010 93:1142–6

-[171]Gosalvez et al; Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril* 2011;96:1083–6.

-[172]Ollero 2001 Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001;16:1912–21.

- [173]Greco et al;. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod. 2005; 20: 226–230.
- [174]Esteves et al; Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. Fertil Steril. 2015 Dec;104(6):1398-405.
- [175]Hull et al. Population study of causes, treatment, and outcome of infertilityBr Med J (Clin Res Ed), 291, 1985, pp. 1693–1697.
- [176]Kaufmann et al; The application of neural Networks in predicting the outcome of in vitro fertilization. Hum Reprod. 1997;12(7):1454–1457.
- [178] Meseguer et al; The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. Hum Reprod. Oct;26(10):2658-7 2011.
- [179]Gardner DK; Lane M;. Culture systems for the human embryo.. Textbook of assisted reproductive technologies. 3rd ed. London: Informa UK Ltd; 2009.
- [180]Conagahn ;Time-lapse imaging of preimplantation embryos.. Semin Reprod Med.2014 Mar;32(2):134-40.
- [181]Sharmal,J; In vitro fertilization and embryo transfer in female genital tuberculosis 2015,Journal of minimal stimulation.
- [182]Gaskins et al; Paternal physical and sedentary activities in relation to semen quality and reproductive outcomes among couples from a fertility center. Hum Reprod. 2014 Nov;29(11):2575-82.
- [183]Niu et al; Effects of uterine adenomyosis on clinical outcomes of infertility patients treated with in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer (IVF/ICSI-ET) Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2015 Feb;35(2):248-51

- [184]Ahmed et al; Maternal age and intracytoplasmic sperm injection outcome in infertile couples at Khartoum, Sudan. 1000Res. 2015 Nov 24;4:1339.
- [185]Nagy et al; Presence of bile acids in human follicular fluid and their relation with embryo development in modified natural cycle IVF. Hum Reprod. 2015 May;30(5):1102-9.
- [186]Oliveira et al; Gonadal response after a single-dose stimulation test with recombinant human chorionic gonadotropin in patients with isolated prepuberal cryptorchidism. Basic Clin Androl. 2016; 26: 13. Published online 2016
- [187]Vaughan; Serum estradiol: oocyte ratio as a predictor of reproductive outcome: an analysis of data from 9000 IVF cycles in the Republic of Ireland. JBRA Assist Reprod. 2016 jul-Sep; 20(3): 142–149.
- [188]Zhang et al; Reduced ectopic pregnancy rate on day 5 embryo transfer compared with day 3: A meta-Analysis PLoS One. 2017; 12(1): e0169837. Published online 2017.
- [189]Men et al; Is the presence of an uncleaved embryo on day 3 a useful predictor of outcomes following day 5 transfer? J Assist Reprod Genet. 2015 Sep;32(9):1379-84.
- [190]Figueira et al; Morphological nuclear integrity of sperm cells is associated with preimplantation genetic aneuploidy screening cycle outcomes. Fertil Steril. 2011 Mar 1;95(3):990-3.
- [191]Scheffer et al; Age as A Predictor of Embryo Quality Regardless of The Quantitative Ovarian Response. Int J Fertil Steril. 2017 Apr-Jun;11(1):40-46. Epub 2016.

-[192]Pokulniewicz et al; in vitro fertilization and age. When old is too old?

Prz Menopauzalny. Mar; 14(1): 71–73. Published online 2015.

-[193]Isa et al; Ovarian stimulation medications and patients responses as prognostic factors in IUI treated infertile Saudi patients. Iran J Reprod Med. 2014 Jul; 12(7): 493–498.

-[194]Tan et al; Female ageing and reproductive outcome in assisted reproduction cycles. 2014 .Singapore Med J.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

1.-Abreviaturas y acrónimos

A continuación se exponen las abreviaturas y acrónimos utilizados en el presente estudio. En el caso de estar en inglés, se reproduce su traducción aproximada.

- ADN: Acido desoxirribonucleico
- ARN: Acido ribonucleico.
- ASEBIR: Asociacion para el Estudio de la Biologia de la Reproduccion.
- β -hCG: Unidad beta de la gonadotropina coriónica humana.
- CCCO: Complejo cúmulo-corona-ovocito.
- CP.- Corpúsculo polar.
- D+1: Dia 1 tras la punción ovárica.
- D+2: Dia 2 tras la punción ovárica.
- D+3: Dia 3 tras la punción ovárica.
- D+4: Dia 5 tras la punción ovárica.
- D+5: Dia 5 tras la punción ovárica.
- FSH: Hormona folículo estimulante.
- Tasa de gestación: Tras la transferencia embrionaria, diagnóstico de embarazo por parte de la ginecóloga.
- Tasa de gestación evolutiva: El embarazo ha seguido su curso y la paciente es dada de alta en nuestra clínica, Ginefiv.
- GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas.
- hCG: Gonadotropina coriónica humana.
- FIV: Fecundación In vitro.
- IA: Inseminación artificial.
- ICSI: Intracytoplasmic morphologically selected sperm (Inyección intracitoplasmatica de espermatozoides seleccionados morfológicamente)
- IFE: índice de fragmentación.
- LH: Hormona luteneizante.

- LN₂: Nitrógeno líquido.
- Mg: miligramo.
- Ml: Mililitro.
- M I: Metafase I.
- M II: Metafase II.
- Mm: mililitro.
- Millones/ml: millones por mililitro.
- N: Número.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- Ptx: Pentoxifiina.
- Rpm: Revoluciones por Minuto.
- SCD: Test de la dispersión de la cromatina (Sperm Chromatin Dispersion).
- SCSA: Test de la dispersión de la cromatina (Sperm Chromatin Assay).
- SEF: Sociedad Española de la Reproducción.
- SPSS: Programa estadístico informático (Statistical Package for Social Sciences) desarrollado por IBM (International Business Machines Corp.).
- Time-lapse: Tecnología de videovigilancia morfocinética, incorporada a la de incubación embrionaria.
- TRA: Tratamiento de Reproducción Asistida.
- Z-score: Clasificación pronuclear. Puede ser: Z1, Z2, Z3 o Z4.
- ZP: Zona pelúcida.